

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YOHANS JOSÉ MARTÍNEZ MONCADA

ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES
DE LAS HOJAS, TALLO Y DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE
Allophylus semidentatus (Miq.) Radlk. (SAPINDACEAE)

CURITIBA

2018

YOHANS JOSÉ MARTÍNEZ MONCADA

ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES
DE LAS HOJAS, TALLO Y DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE
Allophylus semidentatus (Miq.) Radlk. (SAPINDACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas..

Orientadora: Profa.Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Co-orientador: Prof.Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2018

Martínez Moncada, Yohans José

Estudio fitoquímico, actividades biológicas y antioxidantes de las hojas, tallo y del aceite esencial de la especie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (Sapindaceae) / Yohans José Martínez Moncada – Curitiba, 2018.
104 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Alantoína. 2. Antioxidante. 3. Friedelina. 4. Óleo essencial. 5. Toxicidade. I. Miguel, Marilis Dallarmi.
II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.28



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **YOHANS JOSÉ MARTINEZ MONCADA** intitulada: **ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES DE LAS HOJAS, TALLO Y DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (Sapindaceae)**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 17 de Maio de 2018.


MARILYS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MILENA KALEGARI
Avaliador Externo (FPP)


JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre estar siempre presente, sobre todo en los momentos mas difíciles de mi vida y darme las fuerzas suficientes para afrontar las dificultades y superarlas.

A la Organización de Estados Americanos (OEA) y al Grupo COIMBRA de universidades brasileñas por haberme seleccionado entre un grupo de mas de 100 mil aspirantes a los programas de post-graduación en el año 2016.

Al Instituto Universitario de Tecnología “Dr. Federico Rivero Palacio” Región Capital y a la Universidad Central de Venezuela, que gracias a ellos descubrí todo un mundo, no solo dentro de sus aulas, sino también dentro de sus laboratorios, compartiendo historias de vida, haciéndome conocer mis fortalezas y debilidades, por haberme permitido conocer a muchos profesores, alumnos, personal obrero, técnico y de servicio, que de alguna manera marcaron mi corazón, y por darme los conocimientos para afrontar esta vida profesional y vivirla a plenitud.

A la Universidade Federal do Paraná, al Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por la oportunidad brindada.

Gracias a mi madre “Nana”, por la educación que con mucho esfuerzo, sacrificio e ímpetu me dio, por siempre estar en el momento preciso para extenderme su mano y apoyarme incondicionalmente en todo, por convertir los malos pasos en momentos de reflexión, por escucharme y siempre tener una palabra de aliento para mi, por prestarme siempre su hombro para desahogarme en llanto, y por ser mi cómplice en todas las travesuras de mi vida, y por consentirme y darme de comer muchas veces primero que a mi hermano Gabriel.

A mi esposa Marilyn por el amor, cariño, comprensión y apoyo brindado siempre.

A mi hija Adriana por transformar mi vida tan radicalmente, por devolverme la facilidad de dibujar todos los días una gran sonrisa en mi rostro con tan sólo recordarla, por alimentar de el mas puro y sincero amor mi corazón, y por deleitar mis oídos escuchando esa vocecita tierna y dulce diciéndome “Papá”, porque tu eres la razón para luchar y seguir adelante, mi vida es hermosa porque tu existes.

A mi profesora orientadora la Dra. Marilis Dallarmi Miguel, por la generosidad de compartir sus conocimientos y brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, también por la amistad, dedicación, confianza y sobre todo por la paciencia que tuvo conmigo durante la realización de este trabajo.

A mi profesor co-orientador el Dr. Obdulio Gomes Miguel, que compartió conmigo sus conocimientos y técnicas en el laboratorio de fitoquímica y sobre todo por la consideración, paciencia y confianza brindada.

A todos los profesores del Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por las enseñanzas científicas.

A mis compañeros de laboratorio; Alethéia do Santos Furusho, Juliana Girardi, Mariana Oshiro, Camila Freitas de Oliveira, Gisele Joslin, Francis Merino, Filipe Fernandes Horst, Fernando Fernandes, Gustavo Bellei, por compartir un poco de su tiempo, de sus vidas, sus molestias, sus sufrimientos, sus logros, y que de diferentes maneras contribuyeron a la realización de este trabajo, y me enseñaron el verdadero concepto de la “amistad”.

A Amanda Migliorini Urban, por las “brigas” de los últimos meses, por aguantarme en el laboratorio, pero sobre todo por la ayuda brindada inclusive en los momentos difíciles para mí, no fue sencillo culminar este proyecto, sin embargo, siempre me decías que “tudo vai dar certo...”, me ayudaste hasta donde te era posible, por eso y mas, muchas gracias.

Al técnico Paulo Diniz del laboratório de farmacotécnica por el apoyo y la disponibilidad, y a la técnico Maria da Graça de la Central Analítica, por el apoyo brindado.

A Sandra Guimaraes, por haberme abierto las puertas de su casa y ser además de una gran amiga, ser mi “Mamá” aquí en Curitiba.

A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por el aporte financeiro.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

“Las naciones marchan hacia su grandeza al mismo paso que avanza su educación...”

Simón Bolívar

RESUMO

A espécie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Ralchk. pertence à família Sapindaceae, nativa do Brasil, mas não endêmica, tendo ocorrência em todas as regiões do país. A falta de estudos nesta espécie foi a principal razão para o desenvolvimento deste trabalho, o qual foi realizar o estudo fitoquímico, avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas. Estudos realizados em outras espécies do gênero *Allophylus* tiveram propriedades antiinflamatórias, antimaláricas, antiulcerogênicas, analgésicas entre outras. O material vegetal foi coletado na cidade de Curitiba no Brasil e identificado por um especialista do Museu Botânico Municipal de Curitiba. Na análise fitoquímica inicial, constatou-se a presença de alcalóides, compostos fenólicos e triterpenos. O óleo essencial foi extraído das folhas das espécies com uma equipe de Clevenger, obtendo-se um rendimento de 0,73% apresentando como principais compostos γ -muuroleno, δ -cadineno e Z-cariofileno. Os extratos brutos das folhas e caules foram obtidos utilizando etanol como solvente e utilizando um equipamento de Soxhlet. Posteriormente, este extrato bruto foi fracionado com solventes de polaridade crescente para obtenção das frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, através de um equipamento Soxhlet modificado. A partir da fração hexanólica do caule, foi isolado e identificado a alantoína e friedelina. Atividades biológicas e antioxidantes foram realizadas em extratos brutos, frações e óleo essencial. No teste de toxicidade *in vitro* em *Artemia salina*, as frações hexanólica e clorofórmica do caule foram consideradas pouco tóxicas. Nos ensaios da atividade antioxidante pelo método de formação do complexo fosfomolibdeno, a fração acetato de etila do caule apresentou uma atividade de 151,55% em relação ao padrão de rutina, enquanto a mesma fração, estudada pelo método de redução do radical DPPH apresentou a maior atividade, com IC₅₀ de 9,20 μ g/mL. No teste de compostos fenólicos totais, novamente a maior atividade foi observada na fração acetato de etila do caule (135,06 \pm 0,44mg EAG/g), enquanto o óleo essencial apresentou um valor de (30,17 \pm 0,29mg EAG/g). Na atividade alelopática, evidenciou-se a influência negativa de vários parâmetros medidos em *Lactuca sativa*, especialmente aqueles registrados pelo óleo essencial.

Palavras-chave: Sapindaceae. *Allophylus*. Óleo essencial. Alantoína. Friedelina. Toxicidade. Antioxidante. Hemólise.

ABSTRACT

The *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. specie belong to the family of Sapindaceae, which is native to Brazil but not endemic. It is confirmed to have been found in all regions of the country. The lack of studies in this specie was the main reason to this work, which it is the aim to perform phytochemical studies. In this sense, we evaluate the antioxidant properties and biological activities. In previous studies, other species of the genus *Allophylus* had indicated the presence of anti-inflammatory, antimalarial, antiulcerogenic, analgesic properties and others properties. The vegetal material was collected in the Curitiba city (Brazil), and was identified by a specialist of the Municipal Botanical Museum of the same city. In the initial phytochemical analysis, the presence of alkaloids, phenolic compounds and triterpenes was evidenced. With a Clevenger's equipment, the essential oil was extracted from leaves of the species. From this type of essays, we obtaining a efficiency of 0.73%, showing as majority compounds: γ -muurolene, δ -cadinene and Z-caryophyllene. The raw extract was obtained using ethanol as solvent and using a Soxhlet equipment. Later, this extract was fractionated by using solvents of increasing polarity and a modified Soxhlet equipment, to obtain the fractions of hexane, chloroform, ethyl acetate and remanescent. From the hexanolic fraction of the stem, allantoin and friedelin were isolated and identified. Biological and antioxidant activities were performed on raw extract, fractions and essential oil. In the *in-vitro* toxicity test to the *Artemia salina*, hexanolic and chloroformic fractions of stems were found slightly toxic. In the tests of antioxidant activity, by means of the formation of the fosfomolibdeno complex method, the ethyl acetate fraction of stems presented an activity of 151.55%, compared with the routine pattern. Whereas that the same fraction studied by means of reduction of the DPPH radical method showed the highest activity, with an IC_{50} of 9.20 $\mu\text{g/mL}$. In the test of total phenolic compounds, the fraction of ethyl acetate of the stem ($135.06 \pm 0.44 \text{ mg EAG/g}$) was who presented a high value again; whereas that the essential oil presented a value of ($30.17 \pm 0.29 \text{ mg EAG/g}$). In the allelopathic activity, the negative influence on several of the parameters measured in *Lactuca sativa* was evidenced, particularly by the essential oil registers.

Keywords: Sapindaceae. *Allophylus*. Essential oil. Allantoin. Friedelin. Toxicity. Antioxidant. Hemolysis

RESUMEN

La especie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Ralbk. pertenece a la familia Sapindaceae, la cuál es nativa de Brasil, pero no endémica, teniendo ocurrencias confirmadas en todas las regiones del país. La falta de estudios en esta especie fue el principal motivo para el desarrollo de este trabajo, el cual tiene como objetivo realizar el estudio fitoquímico, evaluar las propiedades antioxidantes y actividades biológicas. Estudios realizados en otras especies del género *Allophylus* presentaron tener propiedades antiinflamatorias, antimaláricas, antiulcerogénica, analgésicas, entre otras. El material vegetal fue colectado en la ciudad de Curitiba en Brasil e identificado por un especialista del Museo Botánico Municipal de la misma ciudad. En el análisis fitoquímico inicial se evidenció la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos y triterpenos. El aceite esencial fue extraído de las hojas de la especie con un equipo de Clevenger, obteniéndose un rendimiento del 0,73% presentando como compuestos mayoritarios el γ -muuroleno, el δ -cadinene y el Z-caryophyllene. El extracto bruto de hojas y tallo se obtuvo utilizando etanol como solvente y empleando un equipo de Soxhlet. Posteriormente este extracto bruto fue fraccionado con solventes de polaridad creciente para la obtención de las fracciones de hexano, clorofórmico, acetato de etilo y remanente, a través de un equipo de Soxhlet modificado. A partir de la fracción hexanólica del tallo se aisló e identificó la alantoina y la friedelina. Las actividades biológicas y antioxidantes se realizaron en los extractos brutos, fracciones y aceite esencial. En el ensayo de toxicidad *in vitro* en la *Artemia salina*, las fracciones hexanólicas y clorofórmicas del tallo fueron consideradas levemente tóxicas. En las pruebas de la actividad antioxidante por el método de formación del complejo fosfomolibdeno, la fracción acetato de etilo del tallo presentó una actividad del 151,55% comparada con el patrón rutina, mientras que la misma fracción, estudiada por el método de reducción del radical DPPH, presentó la mayor actividad, con un IC₅₀ de 9,20 μ g/mL. En el ensayo de compuestos fenólicos totales, nuevamente quien presentó un alto valor fue la fracción de acetato de etilo del tallo (135,06 \pm 0,44mg EAG/g), mientras que el aceite esencial presentó un valor de (30,17 \pm 0,29mg EAG/g). En la actividad alelopática se evidenció la influencia negativa en varios de los parámetros medidos en la *Lactuca sativa*, en especial la registrada por el aceite esencial.

Palabras claves: Sapindaceae. *Allophylus*. Aceite esencial. Alantoina. Friedelina. Toxicidad. Antioxidante. Hemólisis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUCIÓN DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> EN BRASIL.....	31
FIGURA 2	ILUSTRACIÓN DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> ..	32
FIGURA 3	FOTOGRAFÍA DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	32
FIGURA 4	FOTOGRAFÍA DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> COLECTADA PARA SU ESTUDIO.....	33
FIGURA 5	FOTOGRAFÍA DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> EN EL LUGAR DE LA COLECTA.....	33
FIGURA 6	ESQUEMA DE TRABAJO DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE ESTUDIO.....	35
FIGURA 7	DISEÑO ESQUEMATICO DEL EQUIPO DE CLEVINGER... ..	45
FIGURA 8	FOTOGRAFÍA DE LA EXCICATA DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	58
FIGURA 9	ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i> EXTRAIDO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN	61
FIGURA 10	CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	63
FIGURA 11	ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	64
FIGURA 12	PRECIPITACIÓN DEL COMPUESTO FC 01.....	68
FIGURA 13	ESPECTRO DE RMN ¹ H DEL COMPUESTO AISLADO FC 01.....	69
FIGURA 14	ESPECTRO DE RMN ¹³ C DEL COMPUESTO AISLADO FC 01.....	69
FIGURA 15	ESTRUCTURA QUÍMICA DEL 2,5-DIOXO-4-IMIDAZOLIDINIL UREA (ALANTOÍNA) DEDUCIDA DE LOS DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN CON SUS RESPECTIVOS DESPLAZAMIENTOS.....	70

FIGURA 16	CRISTALES OBTENIDOS DE LA FRACCIÓN HEXANÓLICA DEL TALLO.....	71
FIGURA 17	ESPECTRO DE RMN ^1H DEL COMPUESTO AISLADO FH3738T.....	72
FIGURA 18	ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO AISLADO FH3738T.....	73
FIGURA 19	ESTRUCTURA QUÍMICA DEL 3-OXO-FRIEDELANO (FRIEDELINA) DEDUCIDA DE LOS DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE HEMÓLISIS DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> CON EL CONTROL TRITÓN AL 1%.....	78
GRÁFICO 2	COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE HEMÓLISIS DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> CON EL CONTROL TRITÓN AL 1%.....	78
GRÁFICO 3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i> POR EL MÉTODO DE FOSFOMOLIBDENO COMPARADO CON BHT.....	80
GRÁFICO 4	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i> POR EL MÉTODO DE FOSFOMOLIBDENO COMPRADO CON RUTINA.....	81
GRÁFICO 5	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i> POR EL MÉTODO DE FOSFOMOLIBDENO COMPARADO CON VITAMINA C.....	81
GRÁFICO 6	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRÓN BHT POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....	80
GRÁFICO 7	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRÓN RUTINA POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....	80
GRÁFICO 8	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRÓN VITAMINA C POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH....	83
GRÁFICO 9	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....	83
GRÁFICO 10	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN HEXANÓLICA DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....	83
GRÁFICO 11	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....	84

GRÁFICO 12	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....84
GRÁFICO 13	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN REMANESCENTE DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....84
GRÁFICO 14	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....85
GRÁFICO 15	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN HEXANÓLICA DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....85
GRÁFICO 16	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....85
GRÁFICO 17	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN ACETATO DE ETILO DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....86
GRÁFICO 18	CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN REMANESCENTE DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....86
GRÁFICO 19	GRÁFICO COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES VALORES DE IC ₅₀ DE <i>Allophylus semidentatus</i> OBTENIDOS POR LA REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH.....87
GRÁFICO 20	CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>88
GRÁFICO 21	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE <i>A. semidentatus</i>90
GRÁFICO 22	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> EN PRESENCIA DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE <i>A. semidentatus</i>92

GRÁFICO 23	INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN LA GERMINACIÓN DE LA <i>Lactuca sativa</i>93
GRÁFICO 24	CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE <i>A. semidentatus</i>95
GRÁFICO 25	CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE <i>A. semidentatus</i>96
GRÁFICO 26	CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE <i>A. semidentatus</i>97
GRÁFICO 27	CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE <i>A. semidentatus</i>99
GRÁFICO 28	CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE <i>A. semidentatus</i>99
GRÁFICO 29	CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE SEMILLAS DE <i>L. sativa</i> (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE <i>A. semidentatus</i>100

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1	PROPIEDADES MEDICINALES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA SAPINDACEAE.....29
CUADRO 2	PROPIEDADES MEDICINALES DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Allophylus</i>30
CUADRO 3	TAXONOMIA DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> ...30
CUADRO 4	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm) DE LAS SEÑALES DE RMN DE LA ALANTOÍNA, 500MHz, DMSO d ₆70
CUADRO 5	DATOS DE RMN ¹³ C (125MHz CDCl ₃) DEL COMPUESTO FH3738T EN COMPARACIÓN CON LOS DATOS REPORTADOS EN LA LITERATURA.....73

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	RESULTADOS DEL CONTENIDO DE CENIZAS EN HOJAS Y TALLO DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	59
TABLA 2	RESULTADOS DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN HOJAS Y TALLO DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	60
TABLA 3	SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i> EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL.....	62
TABLA 4	COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. semidentatus</i> DETERMINADOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.....	63
TABLA 5	RESULTADO DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 20%.....	65
TABLA 6	RESULTADO DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO AL 20%.....	66
TABLA 7	RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES EXTRAÍDAS EN EL SOXHELT MODIFICADO.....	66
TABLA 8	ENSAYO DE TOXICIDAD CONTRA <i>Artemia salina</i> EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS, FRACCIONES DE HOJAS, TALLO Y ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i>	75
TABLA 9	ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE <i>Allophylus semidentatus</i> UTILIZANDO SANGRE DE CARNEIRO.....	76
TABLA 10	ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE <i>Allophylus semidentatus</i> UTILIZANDO SANGRE DE CARNEIRO.....	75
TABLA 11	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA REDUCCIÓN DEL COMPLEJO FOSFOMOLIBDENO DE LAS HOJAS Y ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	79
TABLA 12	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA REDUCCIÓN DEL COMPLEJO FOSFOMOLIBDENO DEL TALLO DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i>	80

TABLA 13	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH DE LOS EXTRACTOS BRUTOS, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE A. <i>Semidentatus</i>87
TABLA 14	CANTIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (EQUIVALENTES EN ÁCIDO GÁLICO-EAG) EN LOS EXTRACTOS BRUTOS, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE A. <i>semidentatus</i>88
TABLA 15	INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN LA GERMINACIÓN DE <i>Lactuca sativa</i>90
TABLA 16	INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN LA GERMINACIÓN DE <i>Lactuca sativa</i>92
TABLA 17	INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN EL CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i>94
TABLA 18	INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN EL CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA <i>Lactuca sativa</i>96
TABLA 19	INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN EL CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE LA <i>Lactuca sativa</i>97
TABLA 20	INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> , EN EL CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i>100

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AA	- Actividad Antioxidante
Abs	- Absorbancia
AAR	- Actividad Antioxidante Relativa
ATCC	- American Type Culture Collection
BHT	- Butilhidróxitolueno
CCF	- Cromatografía de Capa Fina
CDCL ₃	- Clorofórmio Deuterado
CG-EM	- Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas
CGEN	- Conselho de Gestão de Patrimônio Genético
CL ₅₀	- Concentración Letal 50
CIM	- Concentración Mínima Inhibitoria
CLAE	- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
cm	- Centímetro
DESV. EST.	- Desviación Estandar
DL ₅₀	- Dosis Letal 50
DMSO	- Dimetil Sulfoxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
d ₂₀ ²⁰	- Densidad relativa a 20 grados Celsius
d ₆	- Deuterio
EAG/g	- Equivalente de Ácido Gálico por gramo
g	- Gramo
g/L	- Gramo por Litro
H ₂ SO ₄	- Ácido Sulfúrico
HCl	- Ácido Clorhídrico
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
Hz	- Hertz
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IC ₅₀	- Concentración Inhibitoria 50
IK	- Índice de Kovats
kPa	- Kilo Pascal
L	- Litro

M	- Molar
mcg	- Microgramo
mcg/mL	- Microgramo por mililitro
mg	- Miligramo
mg/mL	- Miligramo por Litro
m/m	- Masa-masa
MHz	- Mega Hertz
Min	- Minuto
mL	- Mililitro
mL/min	- Mililitro por minuto
mm	- Mililitro
mmol/mL	- milimol por mililitro
N	- Normal
NaCl	- Cloruro de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
Na ₂ CO ₃	- Carbonato de sódio
nm	- Nanómetro
nº	- Número
n _d ²⁰	- Índice de refracción a 20 grados Celsius
PBS	- Salina Tamponada Fosfato
pH	- Potencial Hidrogénico
ppm	- Parte por millón
RMN	- Resonancia Magnética Nuclear
Rpm	- Revoluciones por minuto
v/v	- Volúmen/Volúmen
W	- Watt
UV	- Ultra Violeta
%	- Por ciento
>	- Mayor que
<	- Menor que
±	- Mas o menos
µg	- Microgramo
µg/mL	- Microgramo por mililitro
µm	- Micrometro

μL	- Microlitro
$\mu\text{L/mL}$	- Microlitro por mililitro
$^{\circ}\text{C}$	- Grado Celsius
$^{\circ}\text{C/min}$	- Grado Celsius por minuto
$^{\circ}\text{GL}$	- Grado Gay-Lussac

SUMÁRIO

1 INTRODUCCIÓN.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVOS GENERALES.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	28
3.1 FAMILIA SAPINDACEAE.....	28
3.2 GÉNERO <i>Allophylus</i> L.....	29
3.3 ESPECIE <i>Allophylus semidentatus</i> (Miq.) Radlk.....	30
4 ACEITE ESENCIAL.....	34
5 MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	35
5.1 MATERIAL VEGETAL.....	35
5.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.....	36
5.2.1 Cenizas Totales.....	36
5.2.2 Humedad.....	37
5.3 ENSAYO SISTEMÁTICO DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	37
5.3.1 Extracto hidroalcohólico al 20%.....	38
5.3.1.1 Búsqueda de cumarinas.....	38
5.3.1.2 Búsqueda de alcaloides.....	39
5.3.1.3 Búsqueda de flavonoides.....	40
5.3.1.4 Búsqueda de antraquinonas.....	40
5.3.1.5 Búsqueda de esteroides y triterpenos.....	41
5.3.2 Extracto acuoso al 20%.....	41
5.3.2.1 Búsqueda de antocianinas.....	42
5.3.2.2 Búsqueda de heterosídeos saponicos.....	42
5.3.2.3 Búsqueda de heterosídeos cianogénicos.....	43
5.3.2.4 Búsqueda de taninos.....	43
5.3.2.5 Búsqueda de ácidos volátiles.....	44
5.3.2.6 Búsqueda de ácidos fijos.....	44
5.3.2.7 Búsqueda de grupos aminos.....	44
5.4 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Allophylus semidentatus</i>	45
5.4.1 Determinación del rendimiento del aceite esencial.....	46
5.4.2 Análisis físico-químicos del aceite esencial.....	46

5.4.2.1 Determinación de la densidad relativa.....	46
5.4.2.2 Índice de refracción.....	46
5.4.2.3 Solubilidad del aceite esencial en etanol.....	46
5.4.2.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	47
5.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO: EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES.....	47
5.5.1 Preparación del extracto bruto.....	47
5.5.1.1 Contenido de sólidos.....	48
5.5.1.2 Fraccionamiento del extracto bruto etanólico.....	48
5.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO: AISLAMIENTO DE LOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS.....	49
5.6.1 Aislamiento de los constituyentes químicos.....	49
5.6.2 Identificación de los constituyentes químicos.....	49
5.7 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.....	49
5.7.1 Evaluación de la toxicidad frente a la <i>Artemia salina</i>	49
5.7.2 Evaluación de la actividad hemolítica.....	50
5.7.3 Actividad antioxidante.....	51
5.7.3.1 Formación del complejo fosfomolibdeno.....	52
5.7.3.2 Reducción del radical DPPH.....	53
5.7.4 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos.....	54
5.7.5 Actividad alelopática.....	55
5.7.5.1 Procedimiento para la actividad alelopática del aceite esencial.....	56
5.7.5.2 Germinación.....	57
5.7.5.3 Crecimiento.....	57
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
6.1 Obtención del Material Botánico.....	58
6.2 Cenizas Totales.....	59
6.3 Humedad.....	59
6.4 Preparación del Extracto Bruto.....	60
6.5 Extracción del aceite esencial de <i>Allophylus semidentatus</i>	60
6.5.1 Determinación del rendimiento del aceite esencial.....	60
6.5.2 Análisis físico-químicos del aceite esencial.....	61
6.5.2.1 Densidad relativa.....	61
6.5.2.2 Índice de refracción.....	61
6.5.2.3 Solubilidad del aceite esencial.....	62

6.5.2.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	62
6.6 ENSAYO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	65
6.6.1 Extracto hidroalcohólico al 20%.....	65
6.6.2 Extracto acuoso al 20%.....	66
6.6.3 Contenido de Sólidos.....	66
6.7 PARTICIÓN DE LAS FRACCIONES.....	67
6.8 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS.....	67
6.8.1 Compuesto FC 01.....	67
6.8.2 Compuesto FH3738T.....	71
6.9 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.....	75
6.9.1 Evaluación de la toxicidad frente a la <i>Artemia salina</i>	75
6.9.2. Evaluación de la actividad hemolítica.....	76
6.9.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	79
6.9.3.1 Formación del complejo fosfomolibdeno.....	79
6.9.3.2 Reducción del Radical DPPH.....	82
6.9.3.3 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos.....	88
6.9.3.4 Actividad alelopática.....	89
6.9.3.4.1 Germinación.....	90
6.9.3.4.2 Crecimiento radicular.....	93
6.9.3.4.3 Crecimiento del hipocótilo.....	97
7 CONCLUSIONES.....	101
8 CONSIDERACIONES FINALES.....	103
REFERENCIAS.....	104
ANEXO 1 – AUTORIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE ACCESO AL PATRIMONIO GENÉTICO.....	110

1 INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades ha sido reconocido y acogido por muchos países, como una forma de elevar la calidad de vida de sus ciudadanos según Elizagaray (2013). A pesar de la utilización de plantas medicinales por la población de bajo nivel económico, no todas ellas han sido estudiadas según los parámetros científicos modernos (CABIESES, 2000).

El uso de plantas medicinales es una parte importante y con frecuencia, muchas veces subestimada, por parte del sistema oficial de salud. Se utiliza en casi todos los países del mundo, y su consumo va en aumento. Muchos países reconocen la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral del sistema de la atención de salud, que ayude a los gobiernos, a los profesionales de la salud y a los usuarios de los servicios de salud, que el uso de las plantas medicinales sea de manera segura, asequible y efectiva.

El uso de plantas medicinales en Brasil es muy utilizado en el tratamiento científico, terapéutico y en algunos casos hasta es utilizado en ritos religiosos. El ser humano ha buscado, desde hace mucho tiempo, una forma de curar enfermedades, debido a que no todos los medicamentos están disponibles para la población y en algunos casos, no todos tienen acceso a ellos (VICTÓRIO; LAGE, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que la mayoría de los estudios existentes sobre plantas medicinales son insuficientes para ser usadas de forma masiva, por lo cual ha orientado protocolos científicos, para que los ensayos farmacodinámicos y toxicológicos antecedan a la experimentación clínica, así como el control de calidad de estos (MUÑOZ, 2000).

Muchas de las especies que se encuentran en Brasil, todavía no tienen estudios químicos, biológicos ni farmacológicos que permitan y delimiten el control de calidad de las plantas a través de elaboración de monografías oficiales. En estos estudios se deben comprobar sus propiedades terapéuticas. El uso de fitoterápicos, en muchos casos, está fundamentado en el uso popular lo que no presenta un respaldo científico en cuanto a eficacia y seguridad de su uso (YUNES et al., 2001).

Por ello resulta de vital importancia llevar a cabo esta investigación, en la cual su principal propósito es: el de aislar e identificar los principios activos (grupo de metabolitos secundarios) del género *Allophylus semidentatus*, ya que no existe alguna investigación fitoquímica previa, y la misma servirá para realizar diferentes estudios relacionados a actividades biológicas y/o terapéuticas.

Especies del género *Allophylus* poseen diversas actividades biológicas, como por ejemplo: la actividad antimalárica, de la especie *Allophylus africanus*, según Oladosu, et al. (2013). Otro ejemplo de actividad terapéutica de este género, es el de la especie *Allophylus serratus*, que tiene la propiedad anti-ulcerogénica de acuerdo con Poonam (2005), por sólo nombrar dos ejemplos.

La ausencia de trabajos en la especie vegetal, *Allophylus semidentatus*, es la principal motivación para la realización de su estudio, teniendo como objetivos investigar la composición química y actividades biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio fitoquímico y de las actividades biológicas de las hojas, el tallo y el aceite esencial de la especie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (Sapindaceae)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Hacer una revisión bibliográfica de la familia *Sapindaceae*, el género *Allophylus* L. y la especie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk.
- Solicitar la autorización para la realización de la investigación de la especie mencionada.
- Colectar e identificar la especie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk.
- Determinar el porcentaje de humedad y cenizas de las hojas y el tallo.
- Realizar el ensayo sistemático fitoquímico de las hojas y el tallo.
- Obtener el extracto etanólico bruto y las fracciones de las hojas y el tallo.
- Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas de *Allophylus semidentatus*.
- Determinar el rendimiento del aceite esencial.
- Realizar la caracterización físico-químico del aceite esencial.
- Identificar los compuestos mayoritarios del aceite esencial.
- Aislar e identificar las diferentes sustancias químicas a través de técnicas cromatograficas y espectroscópicas.
- Evaluar la actividad tóxica *in vitro* de los extractos, fracciones y aceite esencial.
- Evaluar la actividad hemolítica de los extractos, fracciones y aceite esencial.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos, fracciones y aceite esencial.
- Evaluar el contenido de los compuestos fenólicos de los extractos, fracciones y aceite esencial.
- Evaluar la actividad alelopática de los extractos, fracciones y aceite esencial.

3 REVISIÓN DE LA LITERATURA

3.1 FAMILIA SAPINDACEAE

La familia Sapindaceae, es de distribución básicamente tropical y subtropical, está formada por 150 géneros, que contienen alrededor de 2000 especies, de ellas 300 son lianas herbáceas, mientras que el resto son especies leñosas, arbustos y árboles de acuerdo con Morley (1998). En Brasil existen 25 géneros y 411 especies, de las cuales 92 están en la Floresta Atlântica do Nordeste. Siendo el género *Serjania* el mayor con 220 especies, seguido del género *Paullinia* con 150 y *Allophylus* con 100 especies (SOMNER, 2013).

Más de 50 especies de Sapindaceae son utilizadas por el hombre con fines económicos, destacándose entre ellas, el uso en la construcción civil, industria maderera, alimenticia, farmacéutica y de biocombustible. (GUARIM-NETO, 2000).

Existe una especie de gran importancia económica (perteneciente a esta familia *Sapindaceae*) en Brasil, que es la *Paullinia cupana* Kunth var. *Sorbilis* (Mart.) Ducke, es una planta de origen amazónica de la cual proviene el guaraná, el cual es utilizado en la elaboración de bebidas estimulantes y refrescantes, de ella se emplean las semillas que contienen cafeína y otros alcaloides (SILVIA, 2004). Algunas especies de esta familia presentan aminoácidos del ciclopropano (HARRINGTON, 2005).

La familia Sapindaceae tiene como hábitos arbustos, árboles, trepaderas, con hojas compuestas alternas, pari- o imparipinadas; las flores son pequeñas (generalmente menores de 5mm de largo) y pueden ser actinomorfas o zigomorfas, los frutos son variados, pudiendo ser esquizocarpos con mericarpos samarídeos o cocos drupáceos. Los taxones arbóreos generalmente poseen folíolo terminal abortivo, mientras las trepaderas generalmente presentan látex y estípulas (PERDIZ, 2014). En el CUADRO 1, podemos observar algunos usos de algunas especies de la familia.

CUADRO 1 – PROPIEDADES MEDICINALES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA SAPINDACEAE

ESPECIE	PARTES USADAS	USOS	COMPOSICIÓN O ESTRUCTURA	FUENTE
<i>Cupania cinerea</i>	Hojas	Fiebre, antiinflamatorio	Cupacinoxepino	GACHET, et. al., 2011
<i>Cupania macrophylla</i>	Hojas	Antibiotico	Extracto etanólico	FOGLIANI, et. al., 2004
<i>Dodonae viscosa</i>	Hojas	Antiviral, antiinflamatorio	Dodovisnoid G	ZHANG, et. al., 2016
<i>Matayba elaeagnoides</i>	Hojas	Anticancerígeno	Extracto alcohólico	ZANDONAI, et. al., 2010
<i>Matayba guianensis</i>	Hojas	Antifungico	Extracto alcohólico	ASSIS, et. al., 2014
<i>Melicoccus bijugatus</i>	Fruto (pericarpio)	Antioxidante	Extracto metanólico	PADILLA, et. al., 2008
<i>Serjania herteri</i>	Hojas	Antilesmaniasis	Fracciones de hexano y diclorometano	ALVES, et. al., 2016

FUENTE: EL AUTOR (2018)

3.2 GÉNERO *Allophylus* L.

Según Somner, el género *Allophylus* L. pertenece a la familia *Sapindaceae*, en donde se engloban aproximadamente 100 especies (SOMNER, 2013).

En Brasil, existe ocurrencia de este género en todos los estados, con presencia de aproximadamente 25 especies nativas. En cuanto al hábito o forma de vida del género, puede presentarse como árbol, arbusto o sub-arbusto, con hojas alternas, compuestas imparipinadas, trifoliadas, unifoliadas o raramente pentifoliadas, pecioladas, foliolos con margen entero o dentado-serrados, peciolos alongados, estípulas ausentes. Los frutos son drupas indehiscentes, esquizocárpico, mesocarpio carnoso, endocarpio leñoso, semillas ovoides o sub esféricas, embrión curvo. El género tiene dominio fitogeográfico en la Floresta Amazonica, Caatinga, Cerrado, Bosque Atlántico y Pantanal (SOMNER, 2013).

De dicha revisión se encontró que la especie *Allophylus serratus*, es utilizada en el Sistema de Medicina de la India como un antiinflamatorio y carminativo, también se ha utilizado en la elefantiasis, edema, fractura de huesos, varios trastornos gastrointestinales incluyendo dispepsia, anorexia y diarrea, según Poonam, et. al. (2005). La especie *Allophylus cobbe* L., es una hierba, que crece silvestre en la región montañosa de Bangladesh. Ella tiene actividad antiinflamatoria y se utiliza como agente oxitócico y antidiarreico por los

profesionales de la salud de la región este-oeste de Bangladesh, de acuerdo con Torequi (2012). En el CUADRO 2 podemos observar el uso de algunas especies del género.

CUADRO 2 – PROPIEDADES MEDICINALES DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *Allophylus*

ESPECIE	PARTES USADAS	USOS	COMPOSICIÓN O ESTRUCTURA	FUENTE
<i>Allophylus africanus</i>	Partes aéreas	Antimalárico, conjuntivitis, migraña y diarrea	Sin estudios fitoquímicos realizados	OLADOSU, et. al., 2015
<i>Allophylus cobbe</i>	Toda la planta	Antibacteriano y antifúngico	Extracto alcohólico	TOREQUI, et. al., 2012
<i>Allophylus cominia</i>	Hojas	Antidiabético	Extracto acuoso y sus fracciones	SANCHEZ, et. al., 2014
<i>Allophylus edulis</i>	Hojas	Antiinflamatorio, antioxidante, Antituberculoso	Viridiflorol	TREVIZAN, et. al., 2016
<i>Allophylus serratus</i>	Hojas	Antiulcerogénico	Extracto alcohólico	POONAM, et. al., 2005

FUENTE: EL AUTOR (2018)

3.3 ESPECIE *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk

La *Allophylus semidentatus* es nativa de Brasil, pero no así endémica, teniendo ocurrencias confirmadas en las regiones norte (Acre, Amazonas, Rondonia) nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará) Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso) sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro y Sao Paulo) y en la región sur (Paraná) presentando dominio fitogeográfico Amazonas, Cerrado y Bosque Atlántico, de acuerdo con Somner, et al. (2015). En el CUADRO 3 se muestra la taxonomía de la especie *Allophylus semidentatus*.

CUADRO 3 - TAXONOMIA DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*

JERARQUIA	TAXONOMÍA
Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Rosanae
Orden	Sapindales
Familia	Sapindaceae
Género	<i>Allophylus</i> L.
Especie	<i>Allophylus semidentatus</i>

FUENTE: TRÓPICOS (2017)

La FIGURA 1 muestra la distribución de la especie *Allophylus semidentatus* en Brasil.

FIGURA 1 - DISTRIBUCIÓN DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus* EN BRASIL



FUENTE: SOMNER et. al. (2015)

En relación a la morfología de la especie *Allophylus semidentatus* presenta hábito de árbol y arbusto de 1 a 10m de altura, presenta hojas compuestas trifoliadas dispersas por todo el tallo, presenta un peciolo cilíndrico a subcilíndrico, los folíolos laterales son menores al central, ambos simétricos, elípticos lanceolados, ápice agudo a apiculado, base en los folíolos centrales agudo; ennegrecidos cuando están secos. Presenta inflorescencias axilares, ramificadas más cortas que las hojas. Presenta un fruto monocárpico, globoso a ovoide, pericarpio cartáceo, liso a verrugoso con estrías longitudinales de la base hasta el ápice de color rojo a vinotinto; endocarpio estriado amarilloso (SOMNER, et al., 2015).

La FIGURA 2 y la FIGURA 3, se muestran fotografías de la especie *Allophylus semidentatus*, mientras que la FIGURA 4 muestra un ejemplar de la

especie colectada para su estudio. La FIGURA 5 muestra la especie en el lugar de la colecta.

FIGURA 2 - ILUSTRACIÓN DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*



FUENTE: COELHO (2014)

FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*



FUENTE: COELHO (2014)

FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus* COLECTADA PARA SU ESTUDIO



FUENTE: EL AUTOR (2018)

FIGURA 5 - FOTOGRAFIA DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus* EN EL LUGAR DE LA COLECTA



FUENTE: EL AUTOR (2018)

4 ACEITE ESENCIAL

Es sabido que el uso de aceites esenciales ha sido utilizado desde hace mucho tiempo, antes de la era cristiana, principalmente en países como Egipto, Persia, Japón, China y la India, pero fue sólo a mediados del siglo XVII que comenzaron los estudios de dichas plantas, estos estudios mostraron las propiedades químicas y usos de estos aceites esenciales.

Los aceites esenciales se caracterizan, principalmente, por estar constituidos por varios compuestos volátiles, con presiones de vapor elevadas, en algunos casos con olor, insolubles en agua, sin embargo, solubles en solventes orgánicos.

El termino “esencia” deriva del latin *essentia*. Las esencias o aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias de origen vegetal responsables por el olor agradable o no de las plantas. Estos son producidos dentro de estructuras secretoras espacializadas (glándulas, canales secretores, pelos glandulares, entre otros) los cuales se pueden obtener por un proceso de hidrodestilación con un equipo de Clevenger (OLIVEIRA, 2000).

Los aceites esenciales se encuentran dispersos en los diferentes compartimientos glandulares de cada grupo taxonómico vegetal, como células secretoras epidérmicas localizadas en los tejidos parenquimatosos, bolsas, canales secretores, glándulas externas y pelos secretores. Todos los órganos vegetales pueden acumular aceites esenciales, como flores, hojas, cascara de los tallos, tallos, raíces, rizomas, frutos y semillas, sin embargo, su composición varia dependiendo de la localización (BRUNETON, 1991).

Los aceites esenciales son mezclas que contienen entre 20 y 60 componentes, con concentraciones variadas, caracterizados por dos o tres compuestos principales de concentración entre 20 y 70 %, denominados como mayoritarios y otros elementos, en menores concentraciones o trazas. Estos pueden variar desde terpenos hidrocarbonados, alcoholes simples y terpénicos, aldehídos, cetonas, fenoles, esterres, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgánicos y cumarinas (BAKKALI, 2008).

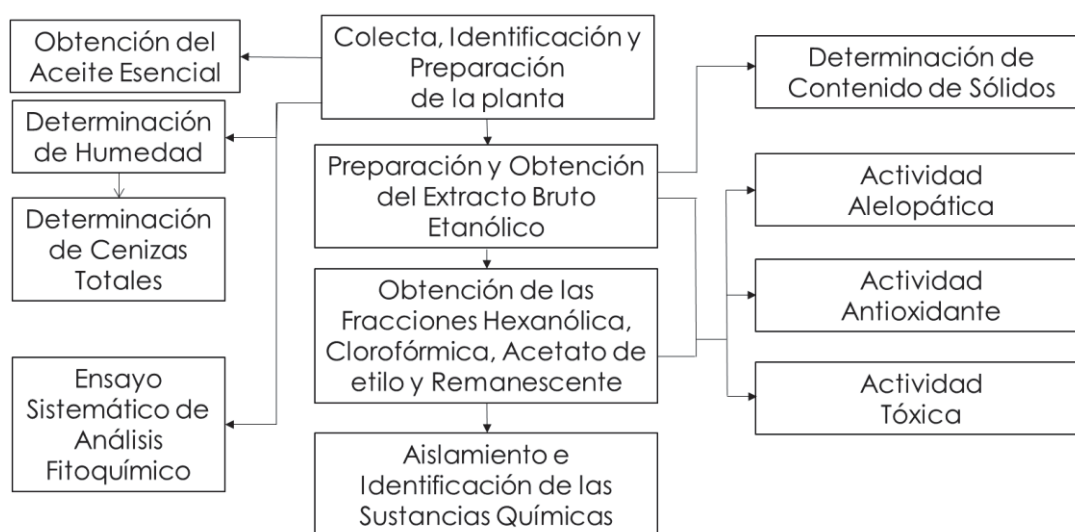
Brasil se encuentra en los cuatro principales países productores de aceites esenciales, solo después de La India, China e Indonesia. Esa posición

esta relacionada con la producción de aceites esenciales de frutos cítricos, los cuales son sub-productos de jugos, principalmente de naranjas (BIZZO, 2009).

5 MATERIAL Y METODOLOGÍA

A continuación en la FIGURA 6, se muestra el esquema de trabajo de forma resumida con las etapas y procedimientos aplicados a la especie estudiada.

FIGURA 6 - ESQUEMA DE TRABAJO DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE ESTUDIO



FUENTE: EL AUTOR (2018)

5.1 MATERIAL VEGETAL

Las hojas y tallos fueron colectados de tres individuos en el Capão do Cifloma, localizado en el Campus Jardim Botânico de la Universidad Federal do Paraná, municipio de Curitiba, Paraná, Brasil, en las coordenadas geográficas 25°26'57.9"S y 49°14'23.4"W, en el mes de septiembre del año 2016. La muestra de este material vegetal fue identificada por un botánico registrado al Conselho de Gestão de Patrimônio Genético (CGEN), en el Museu Botânico Municipal de Curitiba.

El secado del material vegetal colectado fue realizado en sacos o bolsas de plástico, colocados en un lugar ventilado y protegidas del sol y la humedad. Después de estar completamente seco, el material fue triturado con la ayuda de

un molino de cuchillas y martillos, para la realización de los estudios descritos posteriormente.

5.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

5.2.1 Cenizas totales

La determinación de cenizas totales fue realizada con la finalidad de establecer la cantidad de sustancias residuales no volátiles en el proceso de incineración.

El método escogido para la evaluación de las cenizas totales en la especie *Allophylus semidentatus*, está descrito en la Farmacopeia Brasileira 5ª Edición, Año 2010. Previamente a la realización de los análisis, seis crisoles de porcelana fueron calentados por treinta minutos en una mufla a una temperatura de 600°C. Después se enfriaron en un desecador y luego pesados.

Muestras del material vegetal, aproximadamente 3 g, se colocaron uniformemente en los crisoles, los cuales se llevaron a incineración por 6 horas en una mufla a una temperatura de 600 °C, hasta la eliminación total del carbón. Después del enfriamiento en el desecador, los crisoles fueron nuevamente pesados.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de cenizas totales en relación al material vegetal inicial a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas Totales} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

Donde:

P1= Peso del crisol después y enfriado en desecador

P2= Peso del crisol con la muestra después de la calcinación y enfriado en desecador

P3= Peso de la muestra inicial

5.2.2 Humedad

La determinación de humedad fue realizada con la finalidad de determinar la cantidad de sustancia volátil de cualquier naturaleza eliminada.

El método escogido para la determinación de humedad en la especie *Allophylus semidentatus*, está descrito en la Farmacopeia Brasileira 5ª. Edición, año 2010.

Previamente a la realización del análisis, seis crisoles de porcelana fueron desecados. Muestras del material vegetal, aproximadamente 5g, fueron colocados uniformemente en los crisoles, los cuales fueron pesados. Estos crisoles se llevaron a una estufa por un periodo de 2 horas a una temperatura de 100°C. Después del enfriamiento en el desecador, los crisoles fueron nuevamente pesados.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de humedad en relación al material de vegetal inicial a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

Donde:

P1= Peso del crisol con la muestra después de la desecación en la estufa

P2= Peso del crisol con la muestra antes de la desecación en la estufa

P3= Peso de la muestra inicial

5.3 ENSAYO SISTEMÁTICO DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

El ensayo sistemático de análisis fitoquímico preliminar se realiza con la finalidad de caracterizar cualitativamente los principales grupos activos del metabolismo secundario de la especie vegetal en estudio.

Para la elaboración de estas pruebas, fue utilizada la metodología desarrollada por Moreira (1979) y adaptada por Miguel (2003). A partir del material vegetal triturado, fueron preparados extractos hidroalcohólicos al 20% y extractos acuosos al 20%, a los cuales se le realizaron varias reacciones del tipo colorimétricas o de precipitación.

Los componentes químicos buscados en el extracto hidroalcohólico fueron cumarinas, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, esteroides y/o triterpenos. Mientras que en el extracto acuoso: antocianinas, heterosídeos

saponícos, heterosídeos cianogénicos, taninos, grupos aminos, ácidos fijos y/o ácidos volátiles.

5.3.1 Extracto hidroalcohólico al 20 %

La preparación del extracto hidroalcohólico al 20%, se realiza a partir de 40g del material vegetal seco y triturado, el cual se macera con 200mL de alcohol etílico al 70%v/v, en baño de María a 70°C por 1 hora. Este macerado se filtra en papel filtro y completado a un volumen de 200mL con el mismo solvente con el cual se realiza la extracción.

En seguida, el extracto hidroalcohólico se concentra a 1/3 de su volumen, retirando el exceso de alcohol etílico, y realizando el fraccionamiento en un embudo de separación, con solventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y acetato de etilo. Por medio de la solubilidad, estos solventes usados en el fraccionamiento orientan la búsqueda de los compuestos químicos.

En el embudo de separación, está contenido el extracto concentrado, al cual se le adiciona 20mL del primer solvente (hexano). Este paso se repite 10 veces, obteniéndose 200mL. Este procedimiento se realiza de nuevo con los otros solventes, el cloroformo y el acetato de etilo, obteniéndose 200 mL de cada fracción. El residuo del extracto es llamado fracción hidroalcohólica y su volumen es completado a 200mL con etanol al 70%. Las fracciones se deben mantener refrigeradas hasta la realización de la marcha fitoquímica.

5.3.1.1 Búsqueda de cumarinas

La búsqueda se basa en la disolución de cumarinas en medio básico, ocurriendo el rompimiento del anillo pirrólico y formación del ácido hidróxicinámico o sales alcalinas de sus aniones. Las cumarinas pueden ser observadas bajo luz ultravioleta, a 360nm, por medio de la visualización de compuestos fluorescentes de coloración azul o verde.

Para este análisis, 30mL de la fracción de hexano, cloroformo y de acetato de etilo se concentran en baño de María, hasta un volumen de 5mL cada una.

En la fracción hidroalcohólica, 30mL se acidifica hasta pH 1,0 con ácido clorhídrico 2N y posteriormente, también se concentra hasta un volumen de 5mL. Después de enfriadas, las fracciones concentradas se transfieren a un embudo de separación y extraídas con 2 porciones de 10mL de éter etílico. Las fracciones etéreas de las dos extracciones se mezclan y se evaporan en un baño de María hasta obtener un volumen de 5mL.

Se debe colocar 3mL de cada fracción, (hexano, cloroformo, acetato de etilo y etérea) en tubos de ensayos y posteriormente, 2mL de hidróxido de sodio 1N, los cuales se deben adicionar a los tubos de ensayos, los cuales se llevan a una cámara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 366nm, dejándolos expuestos por 15 minutos. Para reacción positiva se debe observar la aparición de fluorescencia azul o verde amarillosa.

5.3.1.2 Búsqueda de alcaloides

La búsqueda cualitativa se basa en la capacidad de combinación de los alcaloides, en estado de sal (extractos ácidos), con iodo y metales pesados (bismuto, mercurio, tungsteno), formando precipitados coloreados.

En esta prueba, 50mL de cada una de las fracciones se lleva a sequedad en baño de María y los residuos se disuelven en 1mL de etanol y 20mL de ácido clorhídrico 1%. Para cada fracción, se transfirieren 1mL a cinco tubos de ensayo. El quinto tubo se usa como control negativo o blanco, conteniendo solamente el extracto hidroalcohólico. En los demás tubos se adicionan dos gotas de los reactivos generales para alcaloides: Meyer (iodo-mercurato de potasio), Dragendorff (iodo-bismutato de potasio), Bouchardart (iodo-iodato de potasio) Bertrand (ácido sílico túngico).

La aparición de precipitado de diferentes colores indica reacción positiva para alcaloides, siendo el color anaranjado-rojizo para el reactivo de Dragendorff, blanco para el reactivo de Mayer y anaranjado para el reactivo de Bouchardart.

5.3.1.3 Búsqueda de flavonoides

Estás pruebas se basan en obtención de reacciones coloreadas. Se deben colocar en cápsulas de porcelana, 10mL de cada una de las fracciones, hexano, cloroformo y acetato de etilo, las cuales deben ser llevadas a sequedad. Después, se deben adicionar 10mL de etanol en las cápsulas, y 5mL de cada cápsula se debe llevar a un tubo de ensayo. La fracción hidroalcohólica no necesita ser llevada a sequedad, de esta fracción también se llevan 5mL a un tubo de ensayo.

Los tubos de ensayo se deben colocar en un baño de hielo y llevarlos a una campana de extracción, se agregan 1cm de cinta de magnesio y se agrega poco a poco ácido clorhídrico concentrado. La reacción positiva desarrolla una coloración dependiendo de las estructuras químicas presentes: las flavonas se colorearán de color amarillo a verdoso, los flavonoles y los dihidroflavonoles con una coloración rojo claro a rojo oscuro, las flavononas con una coloración roja a violeta, los derivados antocianícos con una coloración de roja a rosada y las chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas no presentan coloración.

5.3.1.4 Búsqueda de antraquinonas

Estás pruebas se basan en obtención de reacciones coloreadas. En balones de fondo chato se deben colocar 30mL de las fracciones y 5ml de solución acuosa de ácido sulfúrico al 10%. La solución es dejada en reflujo por un tiempo de 30 minutos. Antes de enfriarse, la solución debe filtrarse en papel filtro con la adición de 10mL de agua destilada. Después de este paso, se debe transferir la solución a un embudo de separación y añadir 2 porciones de 10mL de éter etílico. Los extractos etéreos deben ser reunidos y concentrado en un baño de María hasta un volumen de 5mL. Este volumen debe ser colocado en un tubo de ensayo para la realizar la reacción de Borntraeger, la cual consiste, en adicionar 5mL de hidróxido de amonio con agitación lenta. La reacción es considerada positiva para antraquinonas y/o naftoquinonas con la aparición de una coloración roja.

5.3.1.5 Búsqueda de esteroides y triterpenos

Estas pruebas se basan en obtención de reacciones coloreadas. Se deben colocar en cápsulas de porcelana, 10mL de cada una de las fracciones, hexano, cloroformo y acetato de etilo, las cuales deben ser llevadas a sequedad. El residuo se debe disolver en 5mL de cloroformo y filtrarlos en un algodón. Luego de esto, se deben pipetear 0,1mL, 0,5mL y 1mL del extracto clorofórmico de cada fracción para 3 tubos de ensayo. Los volúmenes deben ser completados hasta 2mL con cloroformo para la realización de las reacciones de Liberman-Bouchard Keller Kelliani.

A) Reacción de Liberman-Bouchard

Esta reacción debe llevarse a cabo en una campana de extracción. En tubos de ensayo se deben adicionar 1mL de anhídrido acético y lentamente 2mL de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de una coloración rosada oscura o azul indica la presencia de la función carbonilo en la posición 3 y doble enlace en las posiciones 5 y 6. El desarrollo de una coloración amarilla posiblemente indica un agrupamiento de metilo en el carbono 14. La coloración verde se debe a la presencia de esteroides y/o triterpenos.

B) Reacción de Keller Kelliani

Se deben transferir a cuatro tubos de ensayo, 2mL de las fracciones de hexano, cloroformo, acetato de etilo e hidroalcohólica los cuales deben ser llevados a sequedad. Después los residuos deben ser disueltos en 2mL de ácido acético glacial y 0,2mL de solución acuosa de clorato férrico al 1% y transferirse a tubos de ensayo conteniendo 2mL de ácido sulfúrico. La aparición de una coloración azul o verde en la fase de contacto de los líquidos o en la fase acética indica la reacción para desoxiazucres, siendo el azul para esteroides y verde para triterpenos.

5.3.2 Extracto acuoso 20%

Para la preparación del extracto acuoso al 20%, se debe pesar 40g de material vegetal seco y triturado, el cual es macerado con 200mL de agua

destilada, en baño de María a 70°C por una hora. Este macerado resultante es filtrado y completado hasta 200mL del mismo solvente extractor.

5.3.2.1 Búsqueda de antociniadinas

Las antociniadinas están presentes en las plantas como pigmentos hidrosolubles los cuales presentan coloraciones que se modifican con las variaciones de pH. En presencia de bases, las antociniadinas reaccionan con los hidróxilos fenólicos libres y presentan coloración azul. Con ácidos, hay formación de sales ($=O^+$) los cuales se colorean de rojo.

Para esta prueba, 5mL de extracto acuoso son colocados en tres tubos de ensayo. En el primer tubo es adicionado ácido clorhídrico hasta pH 4. La aparición de una coloración rojiza indica reacción positiva. El segundo tubo de ensayo se debe alcalinizar con hidróxido de sodio hasta pH 10. La aparición de una coloración azul es reacción positiva. Y el tercer tubo de ensayo se debe neutralizar hasta pH 7, en donde la aparición de una coloración violeta indica reacción positiva.

Para la búsqueda de antociniadina, 10mL del extracto acuoso se deben transferir para un embudo de separación, en el cual se extraen dos veces con alcohol butílico. Las fracciones obtenidas deben ser reunidas y concentradas hasta 5mL después de este paso, cinco gotas de ácido clorhídrico son agregadas y la mezcla debe ser calentada hasta ebullición. La aparición de una coloración roja es reacción positiva.

5.3.2.2 Búsqueda de heterosídeos saponicos

Para la búsqueda cualitativa de heterosídeos saponicos, se deben colocar la misma cantidad de extracto acuoso en tres tubos de ensayo. Los tubos se agitan enérgicamente con movimientos verticales, la altura de la espuma formada es medida. Los tubos de ensayo son dejados en reposo por un periodo de treinta minutos y la altura de la espuma es medido nuevamente. La reacción es considerada positiva cuando la altura es persistente y superior a 1cm de altura.

5.3.2.3 Búsqueda de heterosídeos cianogénicos

En esta prueba es utilizada la reacción de isopurpurato de sodio, en donde se transfieren a un tubo de ensayo 5mL del extracto acuoso, con cuidado de no humedecer las paredes del tubo de ensayo, se adiciona 1mL de ácido sulfúrico 1N y en la boca del tubo de ensayo se suspende una tira de papel picro-sodio, con ayuda de un tapón o tapa.

El papel picro-sodio es preparado a partir de tiras de papel de filtro sumergidas en una solución de ácido pícrico al 1%, las cuales son secadas al abrigo de la luz. Luego las tiras son sumergidas en una solución de carbonato de sodio al 10% y secadas al abrigo de la luz.

El tubo de ensayo que contiene el extracto acuoso y reactivos es llevado al baño de María a 60°C por 30 minutos. La aparición de un color marrón a rojizo en el papel picro-sódico indica reacción positiva.

5.3.2.4 Búsqueda de taninos

En este ensayo, 5mL del extracto acuoso y 5 gotas de una solución de clorato férrico al 1% son colocados en un tubo de ensayo. La aparición de un color azul indica reacción positiva para taninos, una coloración verde indica flavonoides y marrón indica polifenoles.

Otra reacción que también puede ser realizada es la de Staniasny. En un balón de fondo plano, son adicionados 5mL de extracto acuoso, 5 gotas de formaldehído al 37% y 4mL de ácido clorhídrico. El balón es acoplado a un condensador de bolas y es llevado a reflujo por una hora. Después de enfriado, el extracto formol-clorhídrico es filtrado y reservado para la búsqueda de taninos hidrolizables. El material retenido en el filtro es lavado con una solución de etanol al 50% y agregado unas gotas de solución acuosa de hidróxido de potasio al 5%. Al momento de agregar el hidróxido de potasio aparece una coloración verde indica reacción positiva para taninos condensados. En el filtrado reservado, es adicionado exceso de acetato de sodio, sin agitación, y tres a cuatro gotas de solución de cloruro férrico al 1%. Al adicionar el cloruro férrico al 1%, la aparición de un color azul indica reacción positiva para taninos hidrolizables.

5.3.2.5 Búsqueda de ácidos volátiles

En este ensayo, 10mL del extracto acuoso es acidificado con ácido sulfúrico 1N en un tubo de ensayo. El tubo de ensayo es hervido y es medido el pH del vapor con papel indicador. La presencia de ácidos volátiles da como resultado un pH menor a 7,0.

5.3.2.6 Búsqueda de ácidos fijos

En este ensayo, se transfieren 20mL del extracto acuoso a un balón de fondo plano y 2mL de hidróxido de sodio 1N. El balón es acoplado a un condensador de bolas y llevado a reflujo por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, el balón es enfriado y su contenido debe ser acidificado con ácido sulfúrico 1N, y extraído en un embudo de separación, con tres porciones de 10mL de éter etílico. Los extractos etéreos deben ser reunidos, y tratados con carbón activo, siendo posteriormente filtrados y llevados a sequedad en baño de María a 50°C. el residuo es dejado en la estufa a 100°C por 10 minutos. Luego, se enfría y son adicionados 5mL de hidróxido de amonio 1N y la solución es filtrada.

En una tira de papel de filtro, se adicionan tres gotas del filtrado anterior, formando una mancha a la cual se le debe añadir el reactivo de Nessler. Otra mancha es formada solo con gotas del reactivo de Nessler, siendo usado como control. La cinta es llevada a la estufa hasta secarla totalmente y la aparición de una coloración marrón indica reacción positiva para la presencia de ácidos fijos.

5.3.2.6 Búsqueda de grupos aminos

En esta prueba, 10mL del extracto acuoso son concentrados hasta 5mL en un baño de María a 60°C. En una tira de papel de filtro, son adicionadas 5 gotas del extracto acuoso concentrado y encima de la mancha, es colocado el reactivo de Nihidrina, utilizado para control. La cinta es llevada a la estufa (100°C) por 10 minutos y la aparición de un color azul violáceo es reacción positiva para la presencia de grupos aminos.

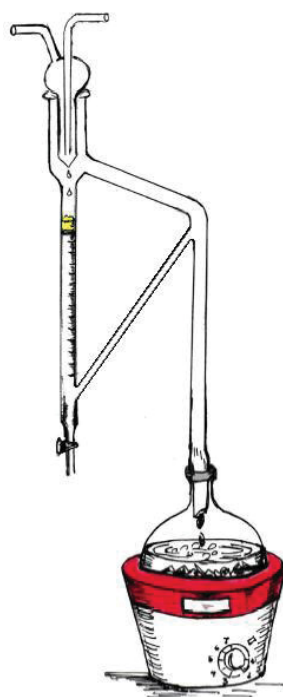
5.4 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus*

El método utilizado para la extracción del aceite esencial de las hojas de *Allophylus semidentatus* fue la hidrodestilación por arrastre de vapor, realizado en un equipo de Clevenger modificado por Wasicky (1963) según Brasil (2010). Se realizó la extracción del aceite esencial de las hojas frescas trituradas a temperatura ambiente, para el cálculo del rendimiento.

En el procedimiento las hojas fueron trituradas y colocadas en un balón de fondo redondo de 3L, adicionando un volumen de 3,5L de agua destilada para cubrir el material vegetal y de esa manera comenzar la extracción, este balón fue colocado en una manta de calentamiento a una temperatura cercana a los 100°C, por un periodo de 6 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a anotar el volumen total de aceite obtenido en la lectura de la escala del tubo que lo contenía. El aceite obtenido fue almacenado en un frasco adecuado el cual fue colocado en el congelador para realizar posteriormente ensayos de caracterización.

En la FIGURA 7 se puede observar un diseño esquemático de equipo de Clevenger usado para la extracción del aceite esencial.

FIGURA 7 - DISEÑO ESQUEMATICO DEL EQUIPO DE CLEVANGER



FUENTE: SINGER (2005)

5.4.1 Determinación del rendimiento del aceite esencial

El rendimiento del aceite esencial fue calculado en %volumen/masa conforme a lo que dicta la 5^{ta}. Edición de la Farmacopeia Brasileira 2010, de esa manera el volumen corresponde al volumen de aceite esencial obtenido en mL y la masa a la cantidad en gramos del material vegetal empleado para realizar la extracción.

5.4.2 Análisis físico-químico del aceite esencial

5.4.2.1 Determinación de la densidad relativa

Para la determinación de la densidad relativa, en vez de usar un picnómetro, se usó un tubo capilar, el cual fue previamente calibrado. La calibración consistió en la determinación de la masa del tubo capilar vacío y del volumen usando agua destilada hervida y enfriada a 20°C. Luego, el aceite esencial fue transferido al tubo capilar, el cual fue pesado para obtener, por diferencia de peso, la masa del aceite esencial. Luego se procedió al cálculo de la densidad relativa (d_{20}^{20}), que no es más que, la relación de las masas del agua y del aceite esencial, ambas a 20°C (BRASIL, 2010).

5.4.2.2 Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia pura es una constante, manteniendo siempre las condiciones de temperatura y presión y, en ocasiones, estas propiedades pueden ser usadas para identificación de la misma, en el siguiente experimento el índice de refracción (n_D^{20}) fue determinado según la Farmacopeia Brasileira 2010, utilizando un refractómetro de ABBE.

5.4.2.3 Solubilidad del aceite esencial en etanol

La determinación de la solubilidad en etanol fue realizada de acuerdo con la Farmacopea Helvética (1993), utilizando etanol 70, 80, 90 % y etanol absoluto, siendo estos análisis realizados en triplicados.

Se colocaron un una buerta 25mL de etanol de diferentes concentraciones y este fue agregado a una muestra de 0,1mL de aceite esencial, después de la solubilización total del aceite esencial se procedió a la lectura del valor de etanol gastado, estableciendo de esta manera la solubilidad de la muestra en función de la concentración del solvente.

5.4.2.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La muestra de aceite esencial para la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas fue diluida en la proporción de 1 μ L/mL en n-hexano. Se utilizó el cromatógrafo CGMS-QP 2010 PLUS - Shimadzu®, equipado con una columna Rt x 5MS – DB-5 (30 mx0,25 μ m), se empleó como gas de arrastre helio, a una presión constante de 59kPa a un flujo constante de 14,2mL/min. La temperatura del inyector fue de 250°C, con una temperatura inicial de 60 °C con una tasa de calentamiento de 3°C/min, aumentando hasta la temperatura fina de 250°C durante 63min.

La identificación de los compuestos del aceite esencial fue realizada por comparación con los datos de la literatura Adams (2007) y con los espectros de la biblioteca NIST 2008 – base de datos del sistema.

Fueron realizados los cálculos del índice de Kovats (IK) para ayudar en la identificación de cada compuesto a través de la comparación del tiempo de retención de la muestra en relación a los patrones de una serie de n-alcanos. Este índice de retención fue propuesto por Kovats en 1958, como parámetros de identificación (SKOOG, 2002).

5.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO: EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES

5.5.1 Preparación del extracto bruto

El extracto bruto es obtenido a través de un equipo de Soxhlet modificado (según la patente PI 06011703-7 A2). El material vegetal fue triturado, pesado y colocado dentro del equipo, el cual contenía una placa porosa sobre la cual se colocó algodón y sobre este, el material vegetal triturado. Este equipo fue acoplado a un condensador de bolas (en la parte superior) y a un balón (en la

parte inferior) el cual contenía 3 o 4 perlas de vidrio. El solvente utilizado para realizar la extracción fue el etanol 96°GL, (3L). Este sistema fue sometido a calentamiento, por medio de una manta, a 60°C. Cuando comenzó el reflujo, se dejó por varias horas, para poder obtener el extracto etanólico. Por medio del calentamiento, el solvente es evaporado, luego el condensador de bolas hizo que el solvente percolara a través del material vegetal. El equipo de Soxhlet es económicamente viable, ya que, la misma cantidad de solvente es utilizado durante todo el proceso de extracción de acuerdo con Carvalho (2001). Esta extracción es realizada tanto para las hojas como para el tallo.

5.5.1.1 Contenido de sólidos

El ensayo de contenido de sólidos se basa en la eliminación de la fase líquida del extracto bruto, permitiendo el cálculo de su rendimiento. Para este análisis es utilizada la metodología descrita en la Farmacopea Brasileira 5ta edición, 2010. En tres placas de Petri, previamente desecadas y taradas, se colocan 10mL del extracto bruto y las placas son llevadas a una estufa a 100°C, hasta que todo el extracto se haya evaporado y las placas tengan peso constante. La diferencia entre el peso de la placa con el residuo del extracto y la placa vacía establece el contenido de sólidos en 10mL de extracto bruto etanólico.

5.5.1.2 Fraccionamiento del extracto bruto etanólico

El extracto bruto etanólico es concentrado en un rotoevaporador hasta que se obtenga un aspecto de extracto fluido, y a partir de este, la obtención de fracciones es realizado por un sistema de partición líquido-líquido. Son utilizados solventes que presentan patrones analíticos y polaridades diferentes, en el siguiente orden: hexano, cloroformo y acetato de etilo.

Para realizar el fraccionamiento es utilizado un equipo de Soxhlet modificado (PI 06011703-7 A2). El equipo contiene el extracto bruto concentrado el cual es conectado a un condensador de bolas y a un balón que contiene perlas de vidrio. En el balón es colocado el primer solvente (hexano) y llevado a reflujo

por varias horas. Este mismo procedimiento es repetido para el resto de los solventes. El extracto final será denominado fracción remanesciente.

5.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO: AISLAMIENTO DE LOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS

5.6.1 Aislamientos de los constituyentes químicos

La purificación es realizada a través de cromatografía de columna abierta. En la columna se coloca una pastilla de sílica-gel 60, a través de la cual se van a incorporar las fracciones. A través de esta columna, se hará eluir solventes con gradiente de polaridad creciente.

En el aislamiento, cada una de las fracciones obtenidas es analizada por cromatografía de columna abierta con diferentes solventes utilizados como fase móvil. Las fracciones colectadas son evaporadas y las que presenten precipitación de cristales, darán origen a las sub-fracciones. Estas sub-fracciones serán purificadas, antes de pasar a la próxima etapa de identificación.

5.6.2 Identificación de los constituyentes químicos

La identificación del compuesto aislado es realizada a partir de la metodología de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

5.7 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

5.7.1 Evaluación de la toxicidad frente a la *Artemia salina*

Fueron adquiridos huevos del crustáceo de la especie *Artemia salina* y se procedió a la preparación del ensayo según la metodología citada por Meyer, et al. (1982).

Los huevos del crustáceo fueron eclodidos en agua salina, preparada con 14,31g de sal marina y disuelta en 400mL de agua purificada. Para esta cantidad se adicionaron 200mg de huevos del crustáceo. La acidez del agua se reguló a un pH entre 8,0 y 9,0 para evitar la muerte de los crustáceos. La temperatura de

eclosión fue controlada entre 27 y 30°C y la solución salina se mantuvo en agitación y aireada constantemente por un periodo de 48 horas. Durante todo el proceso fue mantenida iluminación (20W) sobre el recipiente de eclosión.

Posteriormente, se prepararon soluciones con los extractos y fracciones en concentraciones de 1000µg/mL, 750µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL y 100µg/mL, por triplicado. Se colocaron 10 crustáceos en cada frasco para poder observar los crustáceos vivos.

Los frascos con las soluciones de diferentes concentraciones fueron colocados en una estufa para la eliminación del solvente (metanol), incluyendo los frascos que fueron usados como control, el cual solo contiene el solvente utilizado para la disolución de las muestras. Luego de la evaporación del solvente, se adicionaron, con ayuda de un gotero de vidrio, 10 crustáceos en cada frasco en un volumen aproximado de 2,5 mL de solución salina.

Después de 24 horas se observó cuantos de los crustáceos murieron en presencia de cada una de las concentraciones analizadas. Para la determinación de la CL₅₀, se procedió a utilizar el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21 (Probit) con un intervalo de confianza del 95%. Las fracciones serán consideradas activas cuando el CL₅₀ sea menor de 1000µg/mL (MEYER *et al.*, 1982).

El análisis de varianza fue evaluada por el test de ANOVA y la diferencia estadística fueron por los resultados obtenidos por el test de Tukey, siendo para los valores de $p < 0,05$, fueron considerados como significativos.

5.7.2 Evaluación de la actividad hemolítica

Para la determinación de los porcentajes de hemólisis fue realizado según el método de Banerjee *et al.* (2008), adaptado.

Se transfirieron 5mL de sangre de carneiro de origen comercial, previamente homogenizada con agitación leve, para un tubo de ensayo de centrifugación por un periodo de tiempo de 5 minutos a 3000rpm con 3mL de solución de PBS fría (10°C). Fue necesario realizar 7 lavados con solución de PBS, en donde fue descartándose el sobrenadante. En el último lavado, el sobrenadante se encontraba incoloro. En esta etapa, se realizó una dilución al

2% con los eritrocitos que se encontraban en el fondo del tubo de ensayo, se uso como diluyente solución de PBS.

Para la realización de la prueba de hemólisis se prepararon eppendorfs con hemólisis a 100% (control positivo) utilizándose una solución de tritón al 1%, hemólisis basal (blanco), control con el solvente y las muestras. En la realización del control positivo se pipeteó 200µL de agua potable en 200µL de solución de eritrocito al 2%. Mientras que para el blanco se pipeteó 200µL de solución de PBS en 200µL de solución de eritocito al 2%. En el control del solvente fueron adicionados 20µL de etanol mas 180µL de solución de PBS, en 200µL de solución de eritrocito al 2%. Para la preparación de las muestras, se prepararon soluciones de 1000µg/mL, 500µg/mL, 200µg/mL y 100µg/mL en 200µL de solución de eritrocito al 2%. Para una mejor disolución de las muestras fue adicionados 10% de etanol del volumen total en cada una de las muestras. Tanto las muestras, los controles y el blanco se realizó por triplicado.

Posteriormente, los eppendorfs se homogenizaron con una leve agitación manual. Luego de esto, fueron incubados por un periodo de tres horas en una estufa con temperatura controlada a 37°C. al finalizar la incubación los eppendorfs fueron centrifugados a 3000rpm durante 5 minutos.

La lectura de la absorbancia fue realizada en microplaca de Elisa de 96 pozos, de los cuales fueron pipeteados 200µL del sobrenadante de las muestras. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro de microplaca Multiscan FC de la empresa Thermo Scientific®, a una longitud de onda de 540nm.

El análisis de varianza fue evaluada por el test de ANOVA y la diferencia estadística fueron por los resultados obtenidos por el test de Tukey, siendo para los valores de $p < 0,05$, fueron considerados como significativos.

5.7.3 Actividad antioxidante

La evaluación de una posible actividad antioxidante ejercida por la especie *Allophylus semidentatus* es realizada por el método de reducción del radical DPPH y formación del complejo fosfomolibdeno. El método de reducción del radical de DPPH es rápido, simple y muy utilizado. Las plantas medicinales que presentan actividad antioxidante, reducen el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracilo) por el intercambio de electrones o átomos de hidrógeno. Mientras

el método de formación de complejo fosfomolibdeno permite evaluar la actividad de compuestos lipofílicos e hidrofílicos.

5.7.3.1 Formación del complejo fosfomolibdeno

La técnica de evaluación de la actividad antioxidante con formación del complejo fosfomolibdeno, fue descrita por Prieto, Pineda y Aguilar (1999). Ella permite caracterizar la actividad de compuestos lipofílicos e hidrofílicos. La técnica es fundamentada en la reducción del molibdeno (VI) a molibdeno (V), por la muestra con actividad antioxidante, y formación de un complejo fosfasto-molibdeno (V), de coloración verde en pH ácido, el cual es determinado espectrometricamente a una longitud de onda de 695nm.

El reactivo usado en la reacción debe ser preparado en el momento de su uso a través de la adición de 28mL de fosfasto de sodio 0,1M, 12mL de molibdato de amonio 0,003M y 20mL de ácido sulfúrico 3M, adicionando agua destilada hasta completar un volumen de 100mL. Las muestras analizadas y soluciones patrones de vitamina C deben ser preparadas en metanol en una concentración de 200µg/mL (BIANCO, 2003).

En tres tubos de ensayo, son pipeteados 0,3mL de muestra y 3mL de reactivo, siendo el mismo preparado para los patrones de BHT, rutina y vitamina C. El blanco, utilizado como control negativo, contiene 0,3mL de metanol y 3mL de reactivo. Los tubos deben ser cerrados y llevados a un baño de María a 95°C por un tiempo de 90 minutos.

Los tubos deben ser enfriados a temperatura ambiente, posteriormente son realizadas las lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 695 nm.

La actividad antioxidante relativa (AAR%) es evaluada frente a los patrones de BHT, rutina y vitamina C (patrones considerados con una actividad antioxidante del 100%), según la siguiente ecuación:

$$AAR\% = [(Abs. \text{ de muestra} - Abs. \text{ del Blanco}) \times 100] / (Abs. \text{ patrón} - Abs. \text{ Blanco})$$

El análisis de varianza fue evaluada por el test de ANOVA y la diferencia estadística fueron por los resultados obtenidos por el test de Tukey, siendo para los valores de $p < 0,05$, fueron considerados como significativos.

5.7.3.2 Reducción del radical DPPH

En esta prueba, el DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracilo), es reducido por la acción de un antioxidante, formando el difenil-picril-hidracina, el cual posee una coloración amarilla y no presenta absorción a una longitud de onda 518 nm, como presenta el radical no reducido.

El método es realizado según lo descrito por Mensor et al. (2001). La solución metanólica de DPPH es preparada en el momento de su uso en una concentración de 0,03mmol/mL. También se prepararon soluciones de las muestras y de los patrones BHT, rutina y vitamina C en la concentración de 1mg/mL.

A partir de esta concentración se realizaron diferentes diluciones de forma tal, que cada curva tuviera un mínimo de 5 puntos y contemplara la concentración IC_{50} (concentración necesaria para reducir el 50 % de la concentración inicial de DPPH).

La reacción fue llevada a cabo en una microplaca con fondo plano de 96 pozos, colocando 142 μ L de cada solución diluída con la adición de 58 μ L de solución de DPPH. Para cada muestra y patrón, fue preparado un blanco conteniendo 142 μ L de la solución de cada concentración y 58 μ L de metanol. También fue preparado un control conteniendo 142 μ L de metanol y 58 μ L de solución de DPPH.

Después de 30 minutos de reacción al abrigo de la luz , es realizada la lectura de las absorbancias de las muestras en triplicado en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 518nm, correspondiendo la absorción máxima del radical en estudio. El porcentaje de la actividad antioxidante (AA%) es calculada en porcentaje a partir de la siguiente ecuación:

$$AA\% = [(Abs. \text{ de muestra} - Abs. \text{ del Blanco}) \times 100] / (Abs. \text{ control} - Abs. \text{ Blanco})$$

Para cada concentración de muestra y patrónn analizados fueron calculados el porcentaje de inhibición de DPPH.

Con los valores obtenidos fue realizado un gráfico donde la abscisa representa la concentración y la ordenada representa el porcentaje de actividad antioxidante de las muestras de cada concentración. La ecuación de la recta de ese gráfico, $y=ax + b$, sirvió de base para la determinación del IC_{50} .

El análisis de varianza fue evaluado por el test de ANOVA y la diferencia estadística fueron por los resultados obtenidos por el test de Tukey, siendo para los valores de $p<0,05$, fueron considerados como significativos.

Para la muestra de aceite esencial fue preparada una solución madre de la misma concentración con la adición de Tween 80 en la proporción de 1:1 (m/m). El control estaba constituido por Tween 80 al 0,1 % en metanol y reactivo de DPPH. La reacción fue conforme a lo ya descrito. El resultado del porcentaje de la actividad antioxidante del aceite esencial fue comparado con los resultados encontrados para los patrones de la misma concentración.

5.7.4 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos

El reactivo Folin Ciocalteau contiene aniones heteropoli-fosfotungstato-molibdatos, los cuales, en medio básico, reaccionan con compuestos fenólicos e forma un anión fenolato por la sustracción de un protón ácido, el cual tiene la capacidad de reducir el reactivo de molibdato en óxido de molibdeno formando el complejo molibdeno-tungstenio de coloración azul intenso, probablemente por el mecanismo de transferencia de electrones (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Para este ensayo fue utilizado el método colorimétrico según Singleton (1999) con algunas modificaciones. Las muestras fueron diluidas en metanol de tal forma que la concentración de cad una de ellas fuera e 1mg/mL.

La preparación de este ensayo se desarrolló en dos etapas, la primera, la muestra (0,32mL), el agua (3,1mL) y el reactivo de folin ciocalteau (0,2mL) se mezclaron con la finalidad de homogenizar la mezcla y posteriormente fueron dejados en reposo por un tiempo de 10 minutos. La segunda etapa consistió, después del reposo, en adicionar una solución de carbonato de calcio (Na_2CO_3) al 10% (0,4mL), se agitó y se dejó en reposo por un periodo de 30 minutos, para posteriormente realizar la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro a

una longitud de onda de 760nm. Como control se realizó una curva de calibración de ácido gálico de concentraciones 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 y 17,5µg/mL. Las lecturas se realizaron por triplicado.

Con los resultados del patrón de ácido gálico obtenidos se realizó una curva de calibración (concentración/absorbancia), para obtener la ecuación del gráfico y el valor de R^2 .

El contenido de fenoles totales fue determinado en miligramos de ácido gálico por gramo de muestra, para la curva de calibración fue usada la siguiente curva de calibración:

$$y = 0,0126x + 0,0019; R^2 = 0,9971$$

Donde "y" es la absorbancia y "x" es la concentración final de ácido gálico por la concentración usada en el extracto.

El análisis de varianza fue evaluada por el test de ANOVA y la diferencia estadística fueron por los resultados obtenidos por el test de Tukey, siendo para los valores de $p < 0,05$, fueron considerados como significativos.

5.7.5 Actividad Alelopática

El método de evaluación de la actividad alelopática para los extractos brutos y fracciones fue el descrito por Macias (2000); Chon (2005) y Dias (2005).

Se limpiaron cajas gerbox con una solución de hipoclorito de sodio al 10% y alcohol al 70% e identificadas en ellas los cuadrantes. Para cada muestra y controles ensayados, se usaron 2 cajas gerbox, una de ellas para la verificación de la Germinación y la otra para la verificación del Crecimiento (usándose para como controles agua y metanol). En cada caja se colocaron 2 papeles filtro Whatman nº6, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Para cada extracto y fracción se preparó una solución madre y a partir de esta se realizaron diluciones en metanol con la finalidad de obtener concentraciones de 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL y 1000µg/mL y como controles se utilizó agua destilada y metanol.

En una campana de flujo laminar, se transfirieron 6mL de cada concentración en las cajas gerbox. Para el control con metanol, se transfirieron

6mL de solvente. Tanto las muestras como el control se dejaron a temperatura ambiente, por un periodo de 24 horas, para la evaporación total del solvente.

Luego de la evaporación del solvente, las cajas gerbox fueron llevadas nuevamente a la campana de flujo laminar, las muestras y el control de metanol fueron resuspendidos, humedeciendo los papeles filtro con 6mL de agua destilada. En esta etapa, se preparó un control de agua purificada con 6mL de solvente.

Las cajas gerbox se dividieron en cuatro cuadrantes que representan el cuatrimplicado del ensayo, y en cada uno de estos cuadrantes se colocaron 5 semillas de lechuga (*Lactuca sativa* variedad *Grand rapids*), para tener un total de 20 semillas. Posteriormente las cajas fueron incubadas en una estufa BOD a una temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, durante un periodo de 7 días, para su crecimiento.

5.7.5.1 Procedimiento para la actividad alelopática del aceite esencial

El método empleado para el estudio de la actividad alelopática del aceite esencial está basado en el descrito por Silva et al. (2004).

Se limpiaron cajas gerbox con una solución de hipoclorito de sodio al 10% y alcohol al 70% e identificadas en ellas los cuadrantes. Para cada muestra y controles ensayados, se usaron 2 cajas gerbox, una de ellas para la verificación de la Germinación y la otra para la verificación del Crecimiento (usándose para como controles agua y metanol). En cada caja se colocaron 3 papeles filtro Whatman nº 6, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, uno de estos papeles fue fijado en la tapa de la caja con ayuda de cinta adhesiva y los otros 2 en el fondo de la caja.

Se procedió a preparar una solución madre, usando como agente tensoactivo para la solubilización del aceite esencial, Tween 80 en la proporción 1:1 (v/m). A partir de esta solución madre fueron preparadas varias diluciones en las concentraciones de 0,001%, 0,01%, 0,1% y 1%. Como controles se utilizó agua y Tween 80 al 1% en agua bajo las mismas condiciones de la muestra.

En una campana de flujo laminar, se transfirieron 5mL de agua destilada en los papeles filtros colocados en el fondo de cada caja gerbox. Las cajas se dividieron en 4 cuadrantes que representan el cuatrimplicado del ensayo, y en cada

uno de estos cuadrantes se colocaron 5 semillas de lechuga (*Lactuca sativa* variedad *Grand rapids*), para un total de 20 semillas.

Luego de colocar las semillas, se transfirieron 3mL de cada concentración de cada muestra en el papel colocado en la tapa de la caja. Para los controles agua y Tween 80 1% en agua, se colocó 3mL del respectivo solvente en el papel filtro colocado en la caja de cada tapa. Las cajas gerbox se envolvieron en papel filme de PVC e incubadas en una estufa BOD a una temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, durante un periodo de 7 días, para su crecimiento.

5.7.5.2 Germinación

Durante la germinación son realizadas lecturas diarias, siempre en el mismo horario, abriendo las placas en una campana de flujo laminar, durante siete días. La prueba es realizada con cuatro repeticiones.

5.7.5.3 Crecimiento

Para los bioensayos de crecimiento, es utilizada la metodología descrita por Barnes et al. (1987) y MACIAS et al. (2000). Después de siete días de la salida radicular es realizada la medición de alargamiento de la raíz (radícula) y del hipocolito (diez plántulas por placa) utilizando papel milimetrado. Los resultados de las lecturas de crecimiento son sometidos a la prueba de Tukey para la comparación de las medidas.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención del Material Botánico

Se obtuvo 1565 gramos de hojas, mientras que del tallo se obtuvo la cantidad de 2344 gramos de la especie *Allophylus semidentatus*, previamente este material botánico fue secado a temperatura ambiente y protegido de la luz solar hasta estar seco completamente. La finalidad de este secado es evitar las reacciones de hidrólisis y contaminación microbiana que pudieran ocurrir al estar la planta fresca (SIMOES, et al., 2007).

La identificación de la especie vegetal fue realizada en el Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba, en donde esta depositado un ejemplar de la planta estudiada, bajo el número MBM 304886, la cual se muestra en la FIGURA 8.

FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DE LA EXCICATA DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*



FUENTE: EL AUTOR (2018)

La especie en estudio posee la autorización de acceso al patrimonio genético, permiso necesario y obligatorio para poder realizar estudios en cualquier planta en Brasil, por el Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a través del proyecto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” registrado bajo el nº 02001.001165/2013-47 (ANEXO 1).

6.2 Cenizas Totales

La determinación del contenido cenizas es un parámetro que permite la verificación de impurezas no volátiles que pueden estar presentes como contaminantes en el material vegetal de acuerdo con Farias (2003). En la Farmacopeia Brasileira no se encontró información alguna en relación al porcentaje máximo de cenizas totales que deben tener las drogas vegetales, sin embargo, los resultados obtenidos para la especie *Allophylus semidentatus* fue por debajo del 14%, lo cual no se contradice con otros límites establecidos para otras drogas vegetales ya estudiadas.

En la TABLA 1, se presenta el contenido de cenizas para las hojas y el tallo de la especie *A. semidentatus*.

TABLA 1 - RESULTADOS DEL CONTENIDO DE CENIZAS EN HOJAS Y TALLO DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*

PARTE DE LA PLANTA	% CENIZAS \pm DESV. EST.
Hojas	7,27 \pm 0,12
Tallo	3,20 \pm 0,14

FUENTE: EL AUTOR (2018)

6.3 Humedad

La pérdida por desecación de las partes aéreas de la especie *Allophylus semidentatus* realizada en estufa presentó un contenido de humedad por debajo del 14% el cual es el límite máximo recomendado de humedad para drogas vegetales (BRASIL, 2010).

El contenido de agua o humedad es muy importante, ya que este puede ser un parámetro para el control de calidad vegetal, permitiendo así, tener una característica de seguridad para análisis posteriores, en la preparación de

extractos, rendimiento e identificación de los constituyentes de una planta según Farias (2003) y el control microbiológico para el almacenamiento (FORD et al., 1989).

En la TABLA 2, se presenta el contenido de humedad para las hojas y el tallo de la especie *Allophylus semidentatus*.

TABLA 2 - RESULTADOS DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN HOJAS Y TALLO DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*

Parte de la planta	% Humedad \pm Desv. Est.
Hojas	8,21 \pm 0,12
Tallo	5,83 \pm 0,02

FUENTE: EL AUTOR (2018)

6.4 Preparación del Extracto Bruto

Para la obtención del extracto bruto fue utilizado etanol de 96°GL como solvente extractor. Esta extracción fue realizada en un equipo de Soxhlet modificado y posteriormente concentrado en el mismo equipo hasta un volumen aproximado de 150mL.

6.5 Extracción del aceite esencial de *Allophylus semidentatus*

6.5.1 Determinación del rendimiento del aceite esencial

La extracción del aceite esencial fue realizada a partir de las hojas frescas trituradas en el periodo de primavera (mes de octubre). Durante el proceso de extracción se observó que la mayor cantidad de aceite esencial fue extraída durante las dos primeras horas de la hidrodestilación y en las siguientes cuatro horas restantes el proceso se mantuvo, sin embargo, en una menor proporción. El rendimiento obtenido en la extracción del aceite esencial de *Allophylus semidentatus* fue de 0,73%, el cual se considera un rendimiento elevado, si lo comparamos con otras especies que presentan rendimientos entre un 0,10 y un 0,30%. El aceite esencial extraído de las hojas frescas trituradas de la especie *Allophylus semidentatus* presentó un olor maloliente y pestífero con una coloración amarillenta como puede observarse en la FIGURA 9.

FIGURA 9 - ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus* EXTRAIDO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN



FUENTE: EL AUTOR (2018)

6.5.2 Análisis físico-químicos del aceite esencial

6.5.2.1 Densidad relativa

En relación a la densidad relativa del aceite esencial de *Allophylus semidentatus*, el valor que se obtuvo fue de $0,921 \pm 0,006$ a 25°C . Según Simões y Spitzer (2010), la densidad relativa (d) en relación al agua, los valores para los aceites esenciales deberán estar entre 0,690 y 1,118, y estos podrían variar dependiendo de cada aceite esencial. De esta forma se puede comprobar que el valor obtenido está en el intervalo mencionado por los autores.

6.5.2.2 Índice de refracción

Según Simões y Spitzer (2010), los valores de índice de refracción para cada aceite esencial varían entre 1,450 y 1,590, en la determinación del índice de refracción para el aceite esencial de la especie *Allophylus semidentatus* el valor obtenido fue de 1,503 a una temperatura de 25°C , valor que está dentro de lo propuesto por los autores mencionados.

6.5.2.3 Solubilidad del aceite esencial

La determinación de la solubilidad en etanol de un aceite esencial es una característica física que nos permite la detección de falsificaciones o adulteraciones, ya que para cada aceite esencial, existe un valor que indica la miscibilidad en una solución de etanol/agua, en la cual el aceite esencial es miscible (SIMÕES; SPITZER, 2010).

En la TABLA 3, se presentan los resultados de la solubilidad del aceite esencial de *Allophylus semidentatus*, determinando las partes en las cuales es soluble en diferentes concentraciones.

TABLA 3 - SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL.

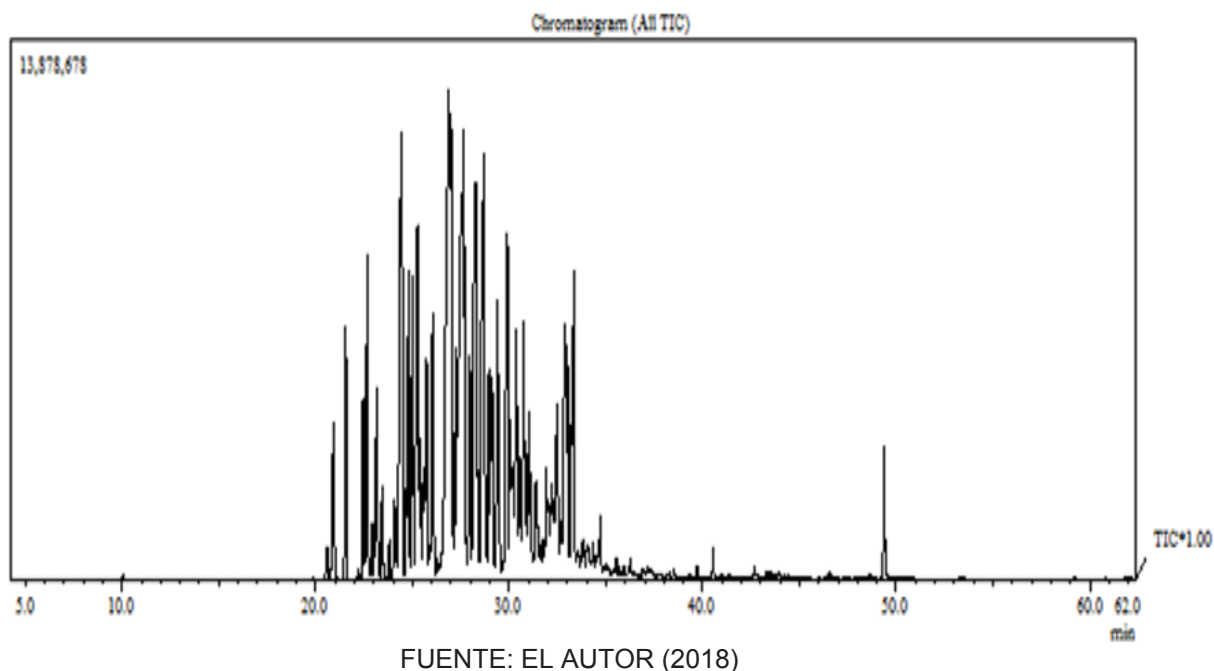
CONCENTRACIÓN DE ETANOL	70%	80%	90%	100%
Volumen gastado (mL)	14,5±0,1	4,6±0,1	1,1±0,1	0,1±0,1
Solubilidad del aceite esencial	1:145	1:46	1:11	1:1

FUENTE: EL AUTOR (2018)

6.5.2.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía gaseosa, es un método simple y sencillo en el cual se emplean columnas capilares, permitiendo esto, el análisis de mezclas de cientos de componentes. El aceite es solubilizado en un solvente como el hexano, el cual es, posteriormente inyectado en un cromatógrafo. La identificación de los compuestos es realizada a través de la comparación del tiempo de retención relativo de las muestras con patrones. La cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, permite obtener informaciones completas en relación al peso molecular y fragmentaciones de los constituyentes y proporciona una mayor seguridad en la identificación de los picos individuales y en el control de la pureza de un pico cromatográfico. Empleando ésta metodología, se consigue separar los constituyentes y proporciona un espectro de masas para cada pico, indicando la masa molecular y el patrón de fragmentación de acuerdo con Bruneton (1991) y Simões; Spitzer (2010). El cromatograma del aceite esencial obtenido de la hojas de la especie *Allophylus semidentatus* esta ilustrado en la FIGURA 10.

FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*



En la TABLA 4 se presentan la mayoría de los compuestos químicos que constituyen el aceite esencial de las hojas de la especie *A. semidentatus* analizado por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas, ensayo realizado por el Departamento de Química de la UFPR, del análisis se logró identificar 30 compuestos (sesquiterpenos) de 41, lo que representa el 73,17% de los constituyentes del aceite esencial.

TABLA 4 - COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE *A. semidentatus* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASEOSA

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÍNDICE DE KOVATS	PORCENTAJE RELATIVO (%)
γ -Elemene	20,917	1434	1,46
α -Cubebene	21,557	1348	1,94
α -Ylangene	22,450	1373	1,33
α -Copaene	22,687	1374	2,80
β -Copaene	23,153	1430	5,33
α -Cubebene	23,433	1348	0,69
Z-Caryophyllene	24,450	1408	6,49
E-Caryophyllene	24,667	1417	0,55
Aromadendrene	25,663	1439	3,74
α -Guaiene	25,373	1437	0,89
α -Humulene	25,737	1452	1,54
γ-Muurolene	27,437	1478	25,52
allo-Aromadendrene	27,650	1458	2,00
α -Muurolene	27,913	1500	2,79
δ-Cadinene	28,703	1522	7,64
cis-Cadina-1,4-diene	28,953	1495	1,36
β -Selinene	29,067	1489	0,77

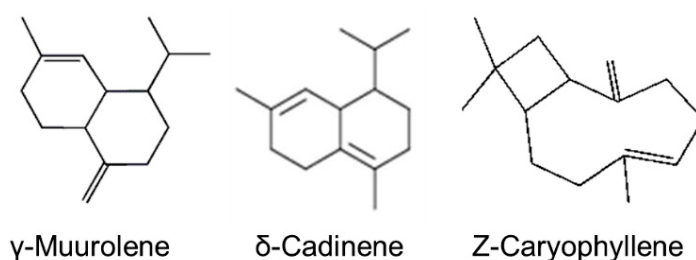
TABLA 4 - COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE *A. semidentatus* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASEOSA

(continuación)			
Germacrene B	29,903	1559	3,50
Z-Caryophyllene	30,037	1408	0,80
Spathulenol	30,373	1577	1,82
Caryophyllene oxide	30,540	1582	0,58
Globulol	30,743	1590	2,76
Elemol	31,110	1548	0,52
Rosifoliol	31,377	1600	0,63
1-epi-Cubenol	31,920	1627	1,87
Epi- α -Muurolol	32,897	1640	5,18
Torreyol	33,003	1644	1,52
cis- β -Guaiene	33,217	1492	1,01
Selin-11-en-4- α -ol	34,710	1658	0,57
E-Phytol acetate	49,380	2218	0,91
Total			73,17

FUENTE: EL AUTOR (2018)

La identificación de los compuestos fue realizada por comparación de los espectros de masa e Índice de Kovats obtenidos con los espectros obtenidos por Adams (2007), a través de los índices de retención (IR) calculados en relación a los tiempos de retención de una serie de alcanos lineales (C₈-C₁₉) analizados en las mismas condiciones descritas. Del análisis cromatográfico podemos observar que los compuestos mayoritarios son: γ -Muurolene (25,52%), δ -Cadinene (7,64%), Z-Caryophyllene (6,49%). En la FIGURA 11 se muestran las estructuras de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de las hojas de la especie *A. semidentatus*.

FIGURA 11 - ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE *A. semidentatus*.



FUENTE: EL AUTOR (2018)

Los resultados obtenidos de del análisis por CG/EM, muestran que los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de la especie *Allophylus semidentatus*, son muy similares a los encontrados en otra especie

del mismo género como lo es *Allophylus edulis*, la cual presentó tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias según (TREVIZAN *et al.* 2016).

6.6 ENSAYO SISTEMATICO FITOQUÍMICO

6.6.1 Extracto hidroalcohólico al 20%

Para el estudio fitoquímico de las hojas y tallo de la especie *Allophylus semidentatus* se utilizó el extracto hidroalcohólico de las cuales se obtuvieron las fracciones de hexano, cloroformo, acetato de etilo y la fracción hidroalcohólica, obteniéndose los resultados que se encuentran en la TABLA 5.

TABLA 5 - RESULTADO DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 20%.

GRUPOS FITOQUIMICOS	HOJAS				TALLO			
	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR
Alcaloides	-	+	-	-	-	+	-	-
Leuciantociniadinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterosidos Flavónicos	-	-	+	+	-	-	+	-
Flavonoides	-	-	+	-	-	-	+	-
Dihidroflavononoles	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavononoles	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	+	-	-	+	+	+	+
Iridoides	-	-	-	-	+	-	+	+
Esteroides/Triterpenos	-	+	-	-	-	+	-	-

FUENTE: EL AUTOR (2018)

FH: Fracción de Hexano; FC: Fracción de Cloroformo; FAC: Fracción Acetato de Etilo; FR: Fracción Remanescente.

En la especie *Allophylus semidentatus*, fue observada reacción positiva para el reactivo de Dragendorff, en las fracciones clorofórmico tanto para las hojas y tallo. Para verificar este resultado se procedió a realizar la contra prueba que consiste en adicionar una solución de ácido tartárico al 5%, para disolver ese precipitado formado, obteniéndose la disolución total del mismo.

En relación a los heterósidos flavónicos, podemos decir que es posible la presencia de una flavona, ya que en la fracción de acetato de etilo e hidroalcohólica hubo un cambio de color de amarillo a rojo lo que se produce por el efecto batocrómico de la Banda I de los derivados flavónicos y la reducción de la función cetona a monoméricos 3,4 dioles o raramente 4-oles.

En el ensayo de cumarinas, se observó en el ultravioleta el aparecimiento de fluorescencia verde amarilla en la mancha número 2 del ensayo en la fracción

clorofórmica de las hojas y el tallo. Esta fluorescencia se debe a que cuando irradiamos con luz ultravioleta, la forma cis migra para la forma trans, en esta conformación, la solución se torna fluorescente al paso de unos minutos.

Para los iridoides, resultó positivo en las fracciones de acetato de etilo y remanesciente con la coloración verde oscura de floroglucinol y rosa cereza para la reacción con ácido sulfúrico y vainilla.

Por último, se realizó la reacción de Libermann Bouchard, la cual mostró la presencia de triterpenos en la fracción de cloroformo de hojas. El color verde entre los dos líquidos, en esa fracción indica la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3 y doble enlace entre 5 y 6 del anillo aromático.

6.6.2 Extracto acuoso al 20%

Para el estudio fitoquímico de las hojas y tallo de la especie *Allophylus semidentatus* se utilizó el extracto acuoso, obteniéndose los resultados que se encuentran en la TABLA 6.

TABLA 6 - RESULTADO DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO AL 20%

GRUPOS FITOQUÍMICOS	HOJAS	TALLO
Heterósido	-	-
Antocianidicos	-	-
Heterósido	-	-
Saponínicos	-	-
Heterósido	-	-
Cianogénico	-	-
Polifenoles	+	-
Flavonoides	-	+
Taninos	-	-
Grupo Amino	+	+
Ácidos Volátiles	-	-

FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: (-) negativo; (+) positivo.

Para la determinación de polifenoles, se realizó la reacción de sulfato de hierro amoniacal en donde el extracto acuoso del tallo se coloreo marrón lo cual indica reacción positiva.

6.6.3 Contenido de sólidos.

Se procedió a realizar el cálculo del contenido de sólidos en donde se obtuvo un resultado de $(0,010 \pm 0,002)$ g/mL para las hojas. Mientras que para el

tallo se obtuvo un valor de $(0,038 \pm 0,006)$ g/mL. Este parámetro es muy importante conocerlo, ya que a partir de este podemos conocer que cantidad de extracto bruto que necesitaremos para la realización de los ensayos y actividades biológicas.

6.7 PARTICIÓN DE LAS FRACCIONES

La partición líquido-líquido de las fracciones fue realizada en un equipo de Soxhlet modificado después de la obtención del extracto bruto. Los solventes utilizados para la obtención de las diferentes fracciones fueron de polaridad creciente (hexano, cloroformo y acetato de etilo) y posteriormente la obtención de la fracción hidroalcohólica remanescente.

En la TABLA 7, se presenta la cantidad en gramos que se obtuvo de cada fracción, tanto para las hojas como para el tallo, así como también el rendimiento en porcentaje en relación a la cantidad de planta colectada.

TABLA 7 - RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES EXTRAIDAS EN EL SOXHLET MODIFICADO

FRACCIÓN	RENDIMIENTO (HOJAS)		RENDIMIENTO (TALLO)	
	GRAMOS	%	GRAMOS	%
HEXANO	27,5610	1,76	11,5036	0,49
CLOROFORMO	8,6494	0,38	7,6930	0,33
ACETATO DE ETILO	1,4917	0,10	8,3878	0,36
REMANESCENTE	1,9901	0,13	64,0844	2,73

FUENTE: EL AUTOR (2018)

6.8 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

6.8.1 Compuesto FC 01

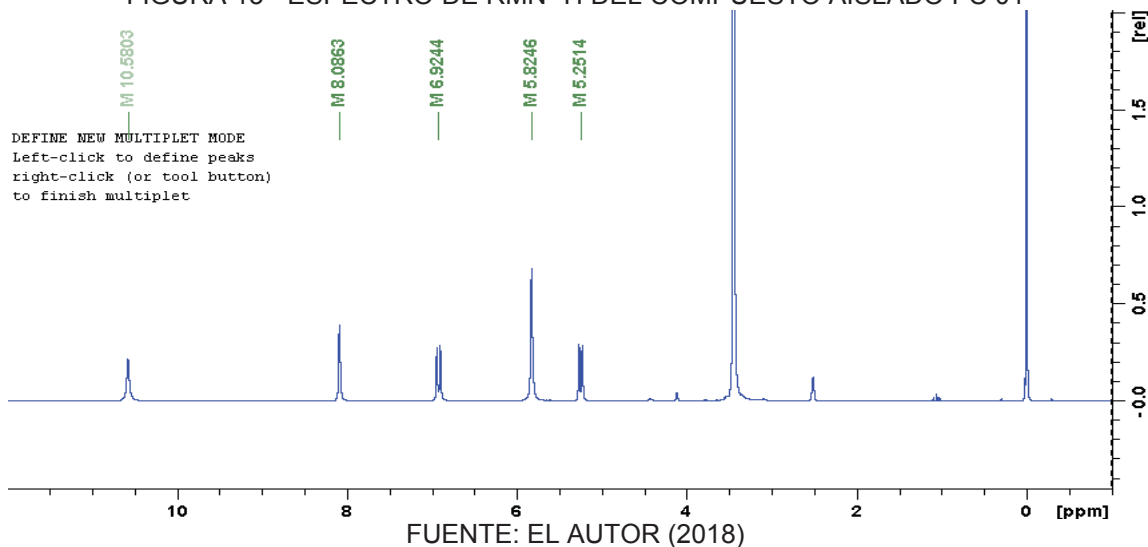
El compuesto FC 01 se obtuvo al momento de realizar el fraccionamiento del tallo de la especie *Allophylus semidentatus*, con el solvente cloroformo, en forma de un fino polvo de coloración beige, el cual se puede apreciar en la FIGURA 12. Para la identificación del compuesto aislado fue empleado un equipo de Resonancia Magnética Nuclear, Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando los núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente.

FIGURA 12 - PRECIPITACIÓN DEL COMPUESTO FC 01

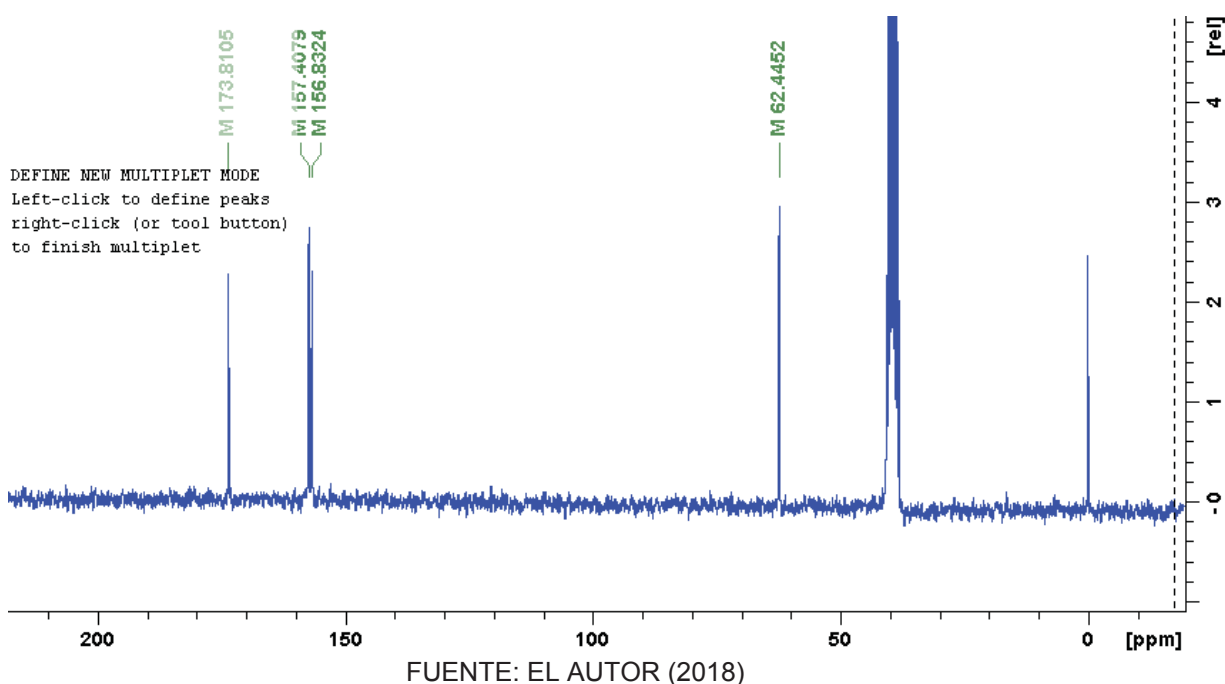


FUENTE: EL AUTOR (2018)

El espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO d_6) (FIGURA 13) del polvo beige aislado presenta señales con desplazamientos químicos (ppm) en varias regiones del espectro. Se puede observar tres señales que corresponden a la integración de un protón, dos señales en forma de singlete con desplazamientos en 10,58 y 8,08ppm, y un doblete con un desplazamiento en 6,92ppm ($J=8,01\text{Hz}$). En la región central del espectro, puede observarse un singlete con un desplazamiento en 5,82ppm, el cual corresponde a dos protones, y por último podemos observar un doblete con un desplazamiento en 5,25ppm ($J=8,01\text{Hz}$), el cual corresponde a un protón. Este último desplazamiento se acopla con la señal de protones con 6,92ppm, siendo estas las únicas correlaciones entre los protones vecinales del espectro.

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN ^1H DEL COMPUESTO AISLADO FC 01

En el espectro de RMN ^{13}C (50 MHz), (DMSO d_6) (FIGURA 14) se pueden observar cuatro señales, de las cuales, tres de ellas con desplazamientos químicos en (173,80, 157,40 y 156,83ppm) los cuales corresponden a carbonos de grupos carbolílicos tipo amida y otro desplazamiento en 62,44ppm. Dos de las tres señales, corresponden a carbonos unidos a átomos electronegativos donadores de densidad electrónica por efecto de resonancia que causan apantallamiento del núcleo de carbono, como nitrógeno.

FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO AISLADO FC 01

Estos resultados de RMN concuerdan con lo reportado por Ferreira et al. (2000) para la alantoína según el CUADRO 4.

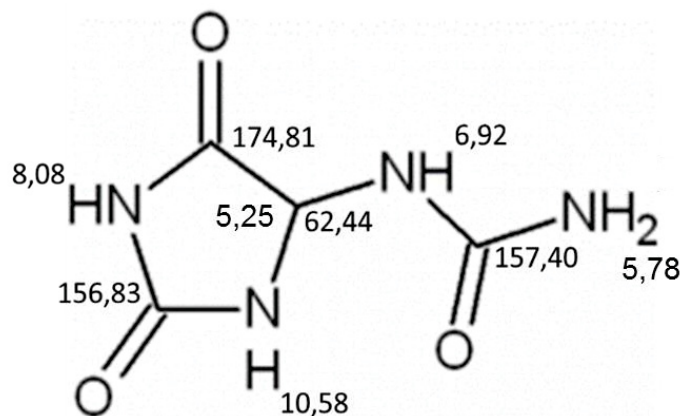
CUADRO 4 - DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm) DE LAS SEÑALES DE RMN DE LA ALANTOÍNA, 500 MHz, DMSO d_6 .

δ ^1H	ppm	(H, mult, J=Hz)	δ ^{13}C	ppm	Grupo
H1	5,78	(2H, s)			-NH ₂
			C1	173,62	-C=O
H2	6,89	(1H, d, J=8,1)			-NH
			C2	156,81	-C=O
H3	10,49	(1H, s)			-NH
			C3	62,46	-CH
H4	8,04	(1H, s)			-NH
			C4	157,43	C=O
H5	5,24	(1H, d, J=8,1)			-CH

FUENTE: FERREIRA (2000)

Basado en los datos espectrales de RMN ^1H y ^{13}C , por comparación de estos con los encontrados en la literatura según Ferreira (2000), el compuesto aislado FC 01 fue identificado como 2,5-dioxo-4-imidazolidinil urea, el cual es conocido comúnmente como alantoína el cual tiene la estructura que se muestra en la FIGURA 15.

FIGURA 15 - ESTRUCTURA QUÍMICA DEL 2,5-DIOXO-4-IMIDIDAZOLIDINIL UREA (ALANTOÍNA) DEDUCIDA DE LOS DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN CON SUS RESPECTIVOS DESPLAZAMIENTOS



2,5-Dioxo-4-imidazolidinil urea (Alantoína)

FUENTE: Adaptado FERREIRA (2000)

La alantoína es un derivado heterocíclico purínico, el cual es ampliamente utilizado por sus propiedades cicatrizantes, además que es bien conocido por ser un compuesto farmacológicamente seguro y no tóxico (ARAUJO et al., 2010).

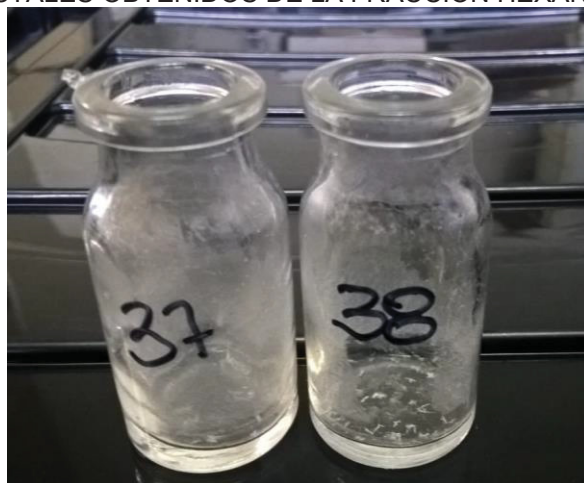
La literatura reporta otros usos farmacológicos de la alantoína como por ejemplo; es usado como antihipertensivo de acuerdo con Chen et al. (2014), y como antiinflamatorio según Lee et al. (2016) y con efectos antinociceptivos según Florentino et al. (2016). Además, la alantoína también demostró tener actividades antiulcerogénicas de acuerdo con Cahen y Clement (1962), sin embargo, el uso de la alantoína en el tratamiento de úlceras gástricas, hasta el momento nunca ha sido estudiado.

La alantoína se puede aislar no sólo del tallo de *A. semidentatus*, sino también de muchas otras especies como por ejemplo; *Memora nodosa* según Silva et al. (2016) y *Symphytum officinalis* de acuerdo con Stickel, Seitz (2000) sólo por nombrar dos ejemplos.

6.8.2 Compuesto FH3738T

El compuesto FH3738T fue aislado de las fracciones hexano 37 y 38, cada una de 10mL, del tallo (90% hexano:10% acetato de etilo), a través de una cromatografía de columna abierta, de la especie *A. semidentatus* en la forma de cristales de agujas, los cuales pueden visualizarse en la FIGURA 16. Para la identificación del compuesto aislado fue empleado un equipo de Resonancia Magnética Nuclear, Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando los núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,13 e 50,62MHz, respectivamente.

FIGURA 16 – CRISTALES OBTENIDOS DE LA FRACCIÓN HEXANÓLICA DEL TALLO

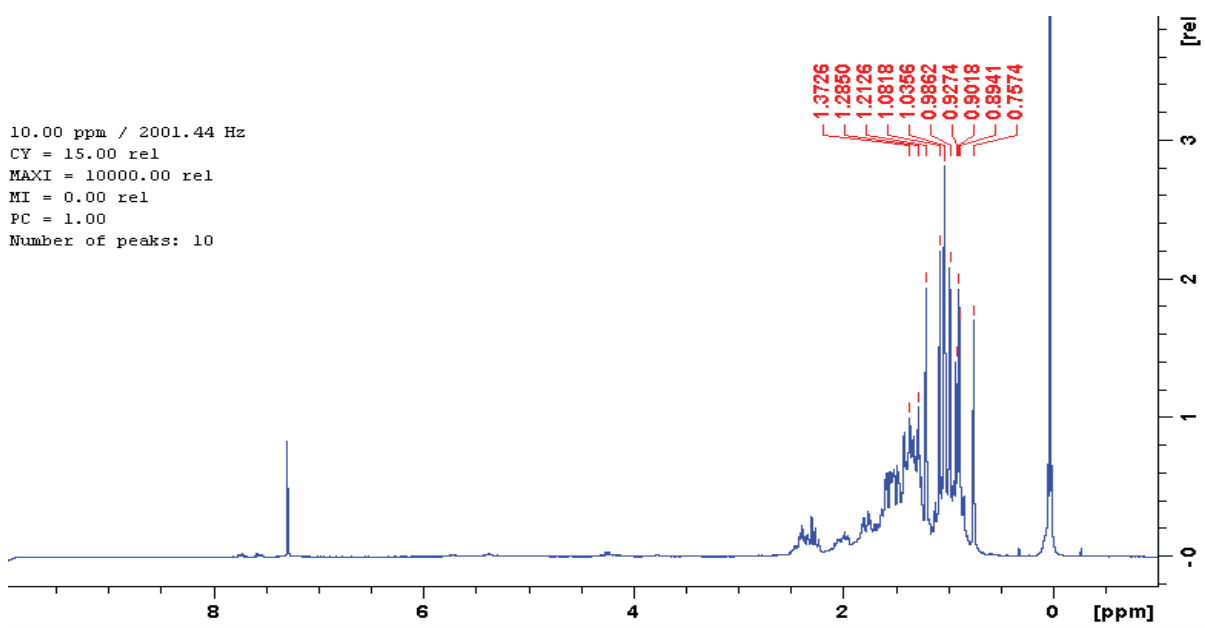


FUENTE: EL AUTOR (2018)

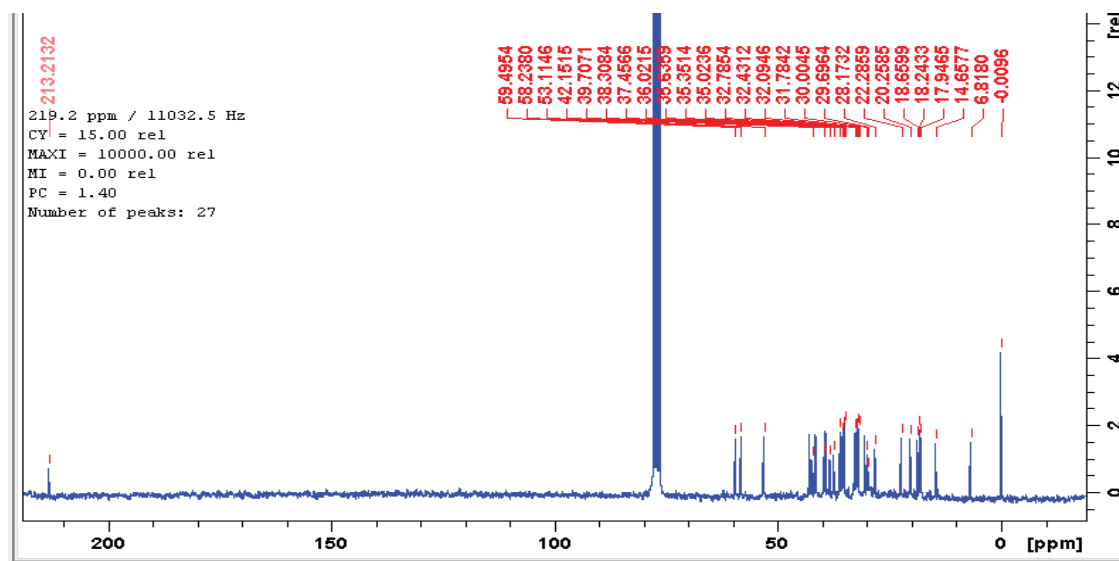
El espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (FIGURA 17) de los cristales con forma de agujas aislados, presentan señales con desplazamientos químicos (ppm) en varias regiones del espectro, en el cual fueron identificados siete singletes entre δ 0,75 y δ 1,37 (δ 0,75; δ 0,92; δ 0,98; δ 1,03; δ 1,21; δ 1,28 y δ 1,37) indicando la presencia de grupos metílicos en la molécula en los carbonos C-24, C-25, C-29, C-30, C-26, C-27 Y C-28, respectivamente, sugiriendo que puede tratarse de un triterpeno. La señal en δ 0,89 muestra la presencia de un doblete atribuidos a los hidrógenos del metilo ubicado en la posición 23.

En el espectro de RMN ^{13}C (50MHz), CDCl_3) (FIGURA 18) se pueden observar varias señales correspondientes a carbonos, los cuales presentan señales por debajo de 60 δ , lo cual es característico de carbonos del tipo sp^3 .

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^1H DEL COMPUESTO AISLADO FH3738T



FUENTE: EL AUTOR (2018)

FIGURA 18- ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO AISLADO FH3738T

FUENTE: EL AUTOR (2018)

La señal en δ 213,21 es atribuida al grupo carbonílico C-3 correspondiente al grupo cetónico. Mientras que la señal en δ 6,81 indica la presencia de un grupo metílico C-23, el cual está bastante protegido atribuido al efecto γ -gauche promovido por el carbonilo.

Los datos espectrales de la sustancia FH3738T en comparación con aquellos identificados en la literatura por Almeida, et al., (2011) y Aragão, et al., (1990), presentados en el CUADRO 5, permiten sugerir que la estructura química de la sustancia aislada se trata del triterpeno pentacíclico 3-oxo-friedelano.

CUADRO 5 - DATOS DE RMN ^{13}C (125MHz CDCl_3) DEL COMPUESTO FH3738T EN COMPARACIÓN CON LOS DATOS REPORTADOS EN LA LITERATURA

Carbono	ALMEIDA, et al.	ARAGÃO et al.	FH3738T
1	22,3 (CH_2)	22,7 (CH_2)	22,3 (CH_2)
2	41,5 (CH_2)	41,8 (CH_2)	42,2 (CH_2)
3	213,2 (C)	213,0 (C)	213,2 (C)
4	58,2 (CH)	58,2 (CH)	58,2 (CH)
5	42,1 (CH)	42,8 (CH)	42,2 (CH)
6	41,3 (CH_2)	41,2 (CH_2)	39,7 (CH_2)
7	18,2 (CH_2)	18,3 (CH_2)	18,2 (CH_2)
8	53,3 (CH)	53,2 (CH)	53,1 (CH)
9	37,5 (C)	37,8 (C)	37,5 (C)
10	59,5 (CH)	59,5 (CH)	59,5 (CH)
11	35,6 (CH_2)	35,2 (CH_2)	35,6 (CH_2)
12	30,5 (CH_2)	32,4 (CH_2)	32,1 (CH_2)
13	39,7 (C)	38,2 (C)	38,3 (C)
14	38,3 (C)	39,7 (C)	38,3 (C)
15	32,8 (CH_2)	30,6 (CH_2)	32,8 (CH_2)
16	36,0 (CH_2)	36,1 (CH_2)	36,2 (CH_2)
17	30,0 (C)	30,0 (C)	30,0 (C)
18	42,8 (CH)	42,9 (CH)	42,2 (CH)

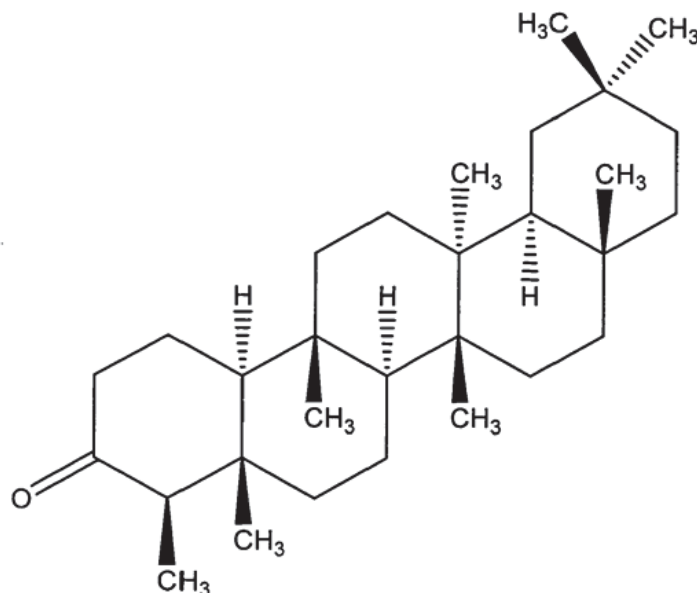
CUADRO 5 - DATOS DE RMN ^{13}C (125 MHz CDCl_3) DEL COMPUESTO FH3738T EN COMPARACIÓN CON LOS DATOS REPORTADOS EN LA LITERATURA (continuación)

19	35,4 (CH_2)	35,3 (CH_2)	35,2 (CH_2)
20	28,2 (C)	28,2 (C)	28,2 (C)
21	32,4 (CH_2)	32,9 (CH_2)	32,4 (CH_2)
22	39,3 (CH_2)	39,3 (CH_2)	39,7 (CH_2)
23	6,8 (CH_3)	6,8 (CH_3)	6,8 (CH_3)
24	14,7 (CH_3)	14,1 (CH_3)	14,7 (CH_3)
25	17,9 (CH_3)	18,2 (CH_3)	18,6 (CH_3)
26	20,3 (CH_3)	18,6 (CH_3)	20,3 (CH_3)
27	18,7 (CH_3)	20,1 (CH_3)	17,9 (CH_3)
28	32,1 (CH_3)	32,1 (CH_3)	29,7 (CH_3)
29	31,8 (CH_3)	31,8 (CH_3)	31,8 (CH_3)
30	35,0 (CH_3)	35,0 (CH_3)	35,4 (CH_3)

FUENTE: ALMEIDA, et al. (2011); ARAGÃO, et al., (1990); EL AUTOR (2018)

El 3-oxo-friedelano es un triterpeno pentacíclico de la serie friedelano y esta se encontraba en el tallo de la especie *A. semidentatus*. Este compuesto posee actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antifúngica y alelopática según Trevisan (2010). En la FIGURA 19 se muestra la estructura química del 3-oxo-friedelano.

FIGURA 19 - ESTRUCTURA QUÍMICA DEL 3-OXO-FRIEDELANO (FRIEDELINA) DEDUCIDA DE LOS DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN



3-oxo-friedelano
(Friedelina)

FUENTE: ALMEIDA, et al. (2011)

6.9 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

6.9.1 Evaluación de la toxicidad frente a la *Artemia salina*

En la TABLA 8 se muestra la relación del número de crustáceos muertos y la CL₅₀ calculada a partir del programa estadístico IBM SPSS Statistics 21 (Probit), tanto para los extractos brutos, fracciones y aceite esencial de las hojas y el tallo.

TABLA 8 - ENSAYO DE TOXICIDAD CONTRA *Artemia salina* EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS, FRACCIONES DE HOJAS, TALLO Y ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus*

Concentración Muestra	MORTALIDAD (µg/mL)					CL ₅₀ (µg/mL)	IC de 95% (µg/mL)
	100	200	500	750	1000		
HOJAS							
EB	0	0	0	0	0	>1000	---
FH	0	1	0	0	0	>1000	---
FC	0	1	0	1	0	>1000	---
FAE	0	0	0	0	1	>1000	---
FR	0	0	0	1	1	>1000	---
AE	0	1	0	0	0	>1000	---
TALLO							
EB	0	1	4	6	12	>1000	
FH	2	3	7	16	21	722,87	562,80-1024,60
FC	0	1	2	12	19	888,73	753,65-1156,85
FAE	0	0	1	3	13	>1000	---
FR	0	1	2	6	15	>1000	---
SQ						142,27	122,48-186,91

FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE) y Fracción remanescente (FR). Aceite esencial (AE). Sulfato de quinidina. (SQ). Intervalo de confianza (IC). Concentración letal (CL₅₀).

Para una muestra ser catalogada o caracterizada como tóxica frente al microcrustáceo, es necesario que las muestras presenten un valor de DL₅₀ inferior a 1000 µg/mL según Meyer et al. (1982). Según esto, los extractos y fracciones resultaron ser tóxicas fueron la fracción hexanólica y la fracción clorofórmica.

6.9.2. Evaluación de la actividad hemolítica

El ensayo de hemólisis *in vitro*, es realizado tanto en los extractos brutos, fracciones y aceite esencial, como una prueba inicial de toxicidad, ya que se evalúa la capacidad de la muestra de romper los eritrocitos. Los resultados obtenidos para hojas y tallo están descritos en la TABLA 9 y 10, respectivamente.

TABLA 9 - ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Allophylus semidentatus* UTILIZANDO SANGRE DE CARNEIRO.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	%HEMÓLISIS \pm DESV. EST.	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
Control	Tritón 1%	100,00 \pm 0,00	a5
EB	100	2,25 \pm 0,11	a1
	200	2,34 \pm 0,21	a1
	500	3,13 \pm 0,25	a1
	1000	4,98 \pm 0,18	a1
FH	100	3,34 \pm 0,15	a1
	200	6,38 \pm 0,14	a1
	500	21,23 \pm 0,28	a2
	1000	59,11 \pm 0,45	a4
FC	100	2,16 \pm 0,29	a1
	200	2,67 \pm 0,08	a1
	500	2,93 \pm 0,16	a1
	1000	3,59 \pm 0,29	a1
FAE	100	1,94 \pm 0,21	a3
	200	2,24 \pm 0,12	a3
	500	5,90 \pm 0,26	a4
	1000	0,00 \pm 0,18	a1
FR	100	2,27 \pm 0,14	a1
	200	2,23 \pm 0,28	a1
	500	0,90 \pm 0,15	a1
	1000	0,00 \pm 0,19	a1
AE	100	51,18 \pm 0,45	a3
	200	49,59 \pm 0,78	a3
	500	61,95 \pm 0,44	a4
	1000	63,38 \pm 0,97	a4

FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente.

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE) y Fracción remanescente (FR). Aceite esencial (AE).

TABLA 10 - ENSAYO DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE *Allophylus semidentatus* UTILIZANDO SANGRE DE CARNERO

MUESTRA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	%HEMÓLISIS \pm DESV. EST.	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
Control	Tritón 1%	100,00 \pm 0,00	a9
	100	2,10 \pm 0,21	a3
	200	2,61 \pm 0,15	a4
EB	500	2,85 \pm 0,15	a4
	1000	11,66 \pm 0,42	a7
	100	0,00 \pm 0,19	a1
FH	200	0,07 \pm 0,12	a1
	500	3,69 \pm 0,15	a4
	1000	66,74 \pm 1,61	a8
	100	0,44 \pm 0,18	a1
FC	200	0,72 \pm 0,25	a1
	500	1,80 \pm 0,15	a2
	1000	4,92 \pm 0,22	a6
	100	0,61 \pm 0,16	a1
FAE	200	0,70 \pm 0,14	a1
	500	1,19 \pm 0,28	a1
	1000	4,81 \pm 0,04	a5
	100	0,23 \pm 0,18	a1
FR	200	0,26 \pm 0,11	a1
	500	0,30 \pm 0,18	a1
	1000	0,58 \pm 0,50	a1

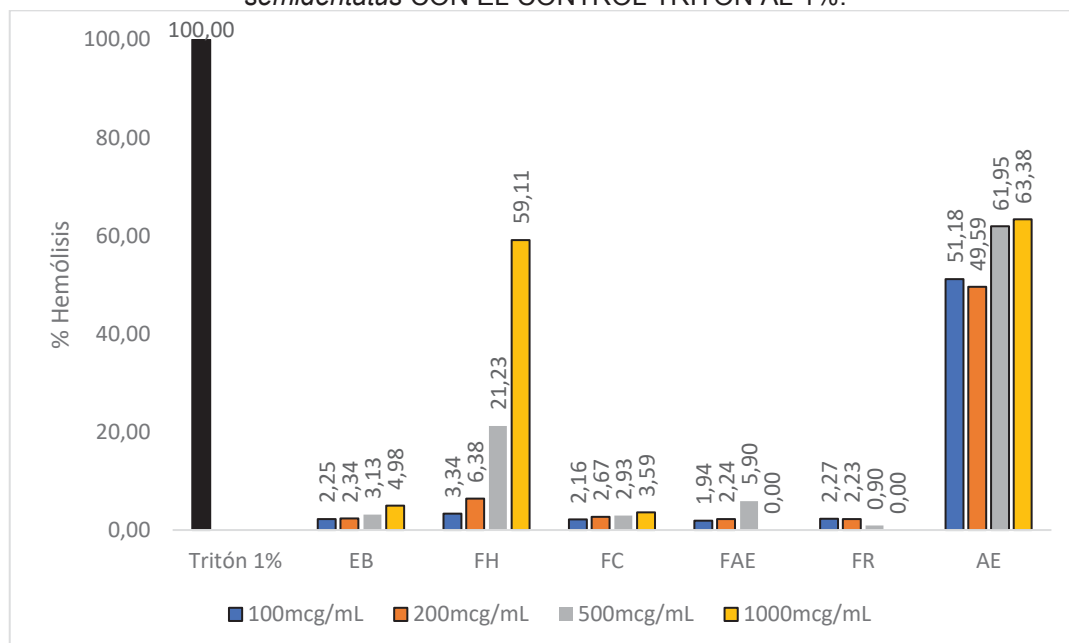
FUENTE: EL AUTOR (2018)* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente.

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE) y Fracción remanesciente (FR).

En los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad hemolítica podemos observar que ni los extractos brutos, las fracciones ni el aceite esencial, no presentaron una respuesta dosis dependiente. Sólo las fracciones de hexano de las hojas y del tallo, en una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, presentaron una hemólisis alrededor del 60%. En cuanto a los resultados del aceite esencial se obtuvo diferentes porcentajes de hemólisis para las diferentes concentraciones evaluadas, esos porcentajes variaron entre un 51% y 63%, de lo que podríamos decir, que presentó una hemólisis moderada.

Para el resto de los extractos y fracciones presentaron un porcentaje de hemólisis menores al 5%, de lo cual podríamos decir que no presentaron actividad hemolítica significativa. Estos porcentajes son en relación al control positivo usado (tritón 1 %). Para una mejor visualización de estos datos estos se muestran en los GRÁFICOS 1 y 2 que se muestran a continuación.

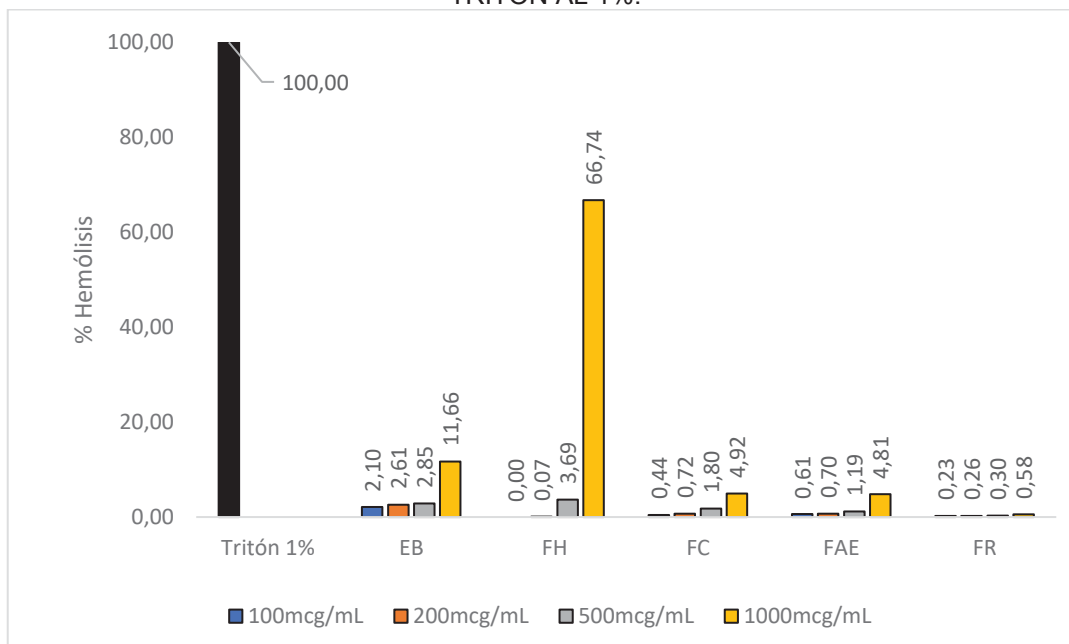
GRÁFICO 1 - COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE HEMÓLISIS DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus* CON EL CONTROL TRITÓN AL 1%.



NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE) y Fracción remanente (FR), Aceite esencial (AE).

FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 2 - COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE HEMÓLISIS DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus* CON EL CONTROL TRITÓN AL 1%.



NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE) y Fracción remanente (FR).

FUENTE: EL AUTOR (2018)

Al observar los resultados obtenidos las fracciones que mostraron una toxicidad media comparada con la toxicidad del patrón tritón 1%, que fueron las

fracciones de hexano de hojas y tallo, y la fracción acetato de etilo de las hojas, lo cual al ser comparados con otras especies del mismo genero concuerda, ya que al revisar la literatura, en estudios realizados en la especie *Allophylus edulis* presentó actividad hepatotóxica según Hofmann et. al. (1992). De acuerdo con Hofmann, los metabolitos responsables de esa acción tóxica son 12 flavonas glicosílicas, lo que concuerda con el estudio de toxicidad realizado, ya que en la fracción remanescente se caracteriza por contener ese tipo de metabolitos.

Al comparar los métodos de actividad hemolítica *in vitro* en *Artemia salina* y la actividad hemolítica en sangre de carnero, podemos observar que se obtuvo una toxicidad media en diferentes fracciones y eso puede deberse a que los mecanismos son diferentes, en el primero la *Artemia salina* es un organismo vivo el cual tiene un mecanismo de defensa, mientras el segundo la hemacia está en contacto directo con los metabolitos presentes en cada extracto y fracción.

6.9.3 Evaluación de la actividad antioxidante

6.9.3.1 Formación del complejo fosfomolibdeno

La actividad antioxidante de cada muestra (extracto bruto, fracción de hexano, cloroformo, acetato de etilo, remanescente y aceite esencial) fue calculada en relación a los patrones de BHT, Rutina y Vitamina C, cuyas actividades fueron consideradas al 100%. Los resultados obtenidos se presentan en las TABLAS 11 y 12 respectivamente.

TABLA 11 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA REDUCCIÓN DEL COMPLEJO FOSFOMOLIBDENO DE LAS HOJAS Y ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*

MUESTRA	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN RELACIÓN A BHT AA(%) \pm DESV. EST. *	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN RELACIÓN A RUTINA AA(%) \pm DESV. EST. *	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN RELACIÓN VIT C AA(%) \pm DESV. EST. *
BHT	100	---	---
RUTINA	---	100	---
VITAMINA C	---	---	100
EB	23,61 a2 \pm 3,22	45,18 a3 \pm 7,71	9,00 a1 \pm 1,45
FH	86,10 a6 \pm 4,43	86,10 a6 \pm 4,43	17,21 a3 \pm 2,06
FC	8,55 a1 \pm 0,74	19,00 a1 \pm 3,05	3,82 a1 \pm 0,94
FAE	23,93 a2 \pm 1,21	34,59 a2 \pm 9,09	9,13 a1 \pm 1,18
FR	19,24 a2 \pm 3,18	42,15 a3 \pm 1,17	8,41 a1 \pm 0,77
AE	170,24 a7 \pm 6,24	280,36 a6 \pm 15,55	65,06 a5 \pm 9,72

FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente.

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanescente (FR) y Aceite esencial. (AE).

TABLA 12 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA REDUCCIÓN DEL COMPLEJO FOSFOMOLIBDENO DEL TALLO DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*

MUESTRA	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN RELACIÓN A BHT AA(%) \pm DESV. EST. *	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN RELACIÓN A RUTINA AA(%) \pm DESV. EST. *	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN RELACIÓN A VIT C AA(%) \pm DESV. EST. *
BHT	100	---	---
RUTINA	---	100	---
VITAMINA C	---	---	100
EB	37,91 a4 \pm 3,53	83,77 a5 \pm 7,82	16,74 a3 \pm 2,31
FH	25,45 a2 \pm 2,09	48,60 a3 \pm 5,33	9,68 a1 \pm 1,06
FC	33,21 a3 \pm 3,27	63,17 a4 \pm 3,67	12,57 a2 \pm 0,43
FAE	55,30 a5 \pm 3,29	105,61 a1 \pm 9,78	21,07 a4 \pm 2,4
FR	2,01 a1 \pm 1,25	3,79 a1 \pm 2,32	0,78 a1 \pm 0,50

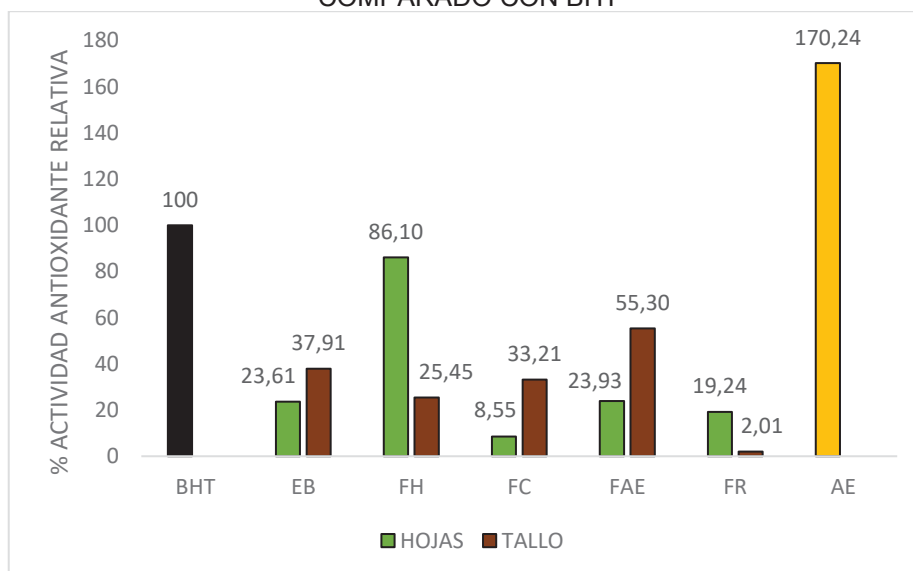
FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente.

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE) y Fracción remanesciente (FR).

Los GRÁFICOS 3, 4 y 5 presentan los resultados del ensayo antioxidante por el método de fosfomolibdeno, donde las barras negras son los patrones, las verdes representan el extracto bruto y las fracciones de hojas y las barras marrones representan el extracto bruto y las fracciones del tallo de la especie *Allophylus semidentatus*.

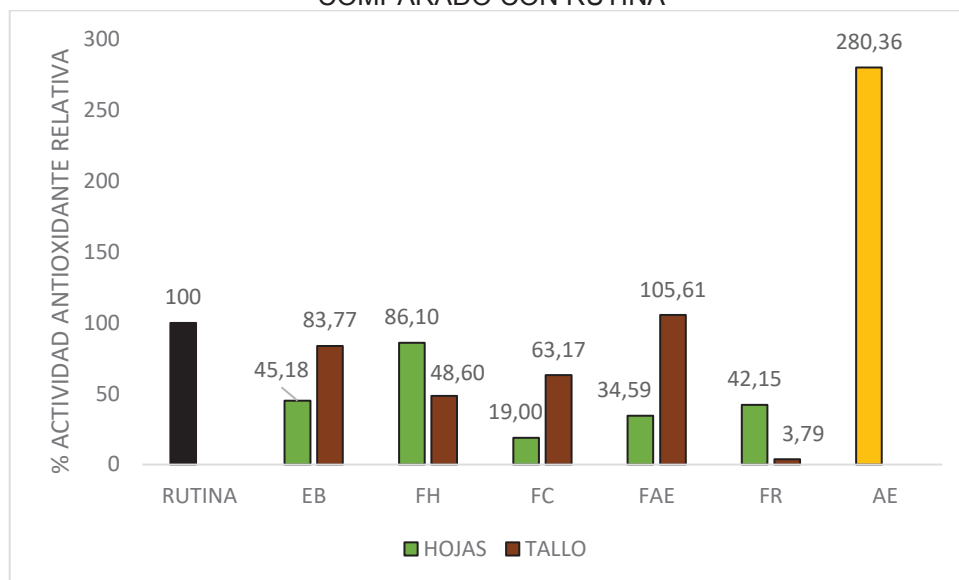
GRÁFICO 3 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus* POR EL MÉTODO DO FOSFOMOLIBDENO COMPARADO CON BHT



FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR) y Aceite esencial (AE).

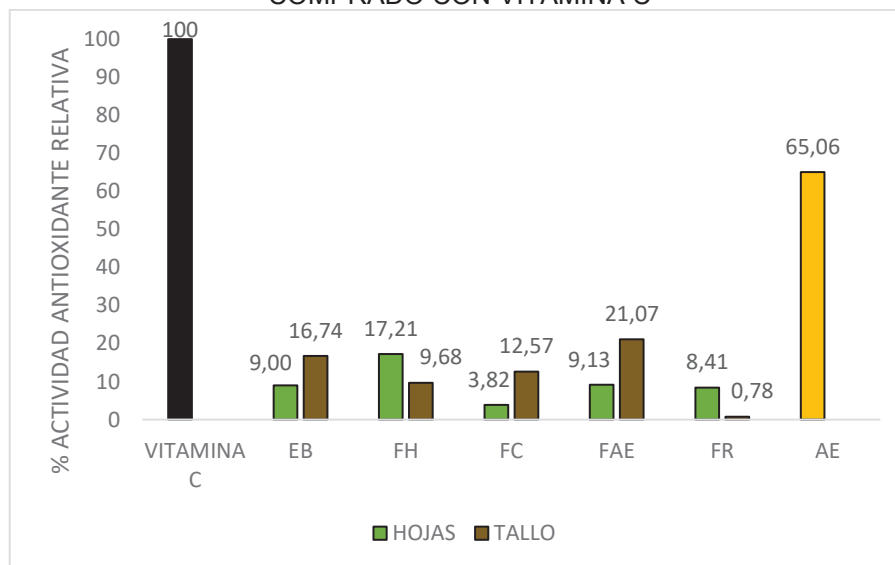
GRÁFICO 4 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus* POR EL MÉTODO DO FOSFOMOLIBDENO COMPARADO CON RUTINA



FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR) y Aceite esencial (AE).

GRÁFICO 5 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE *Allophylus semidentatus* POR EL MÉTODO DO FOSFOMOLIBDENO COMPRADO CON VITAMINA C



FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR) y Aceite esencial (AE).

A partir de los resultados obtenidos de los extractos brutos y las fracciones de las hojas y el tallo de *Allophylus semidentatus*, podemos decir que, el aceite esencial fue quién presentó una mayor actividad antioxidante por reducción del complejo fosfomolibdeno, eso puede explicarse al alto contenido de sesquiterpenos que el aceite esencial posee. Estudios previos en otra especie

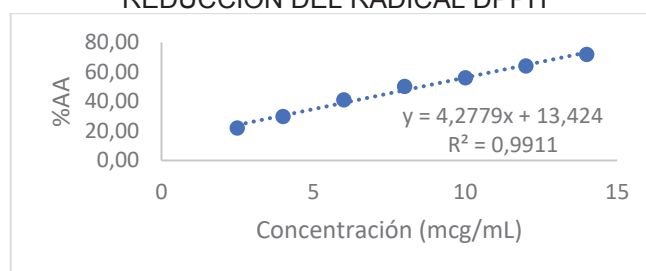
del mismo género, *Allophylus edulis*, el aceite esencial presentó tener una gran actividad antioxidante. Esta especie es usada tradicionalmente como un agente antiinflamatorio natural, estudios científicos realizados demostraron actividad antiinflamatoria y antioxidante (TREVIZAN et. al., 2016).

Las fracciones de acetato de etilo de tallo y hexanólica de las hojas, también presentaron una actividad antioxidante significativa cuando son relacionados o comparados con los patrones utilizados. Otro porcentaje a ser considerado, es el obtenido en el extracto bruto del tallo.

6.9.3.2 Reducción del Radical DPPH

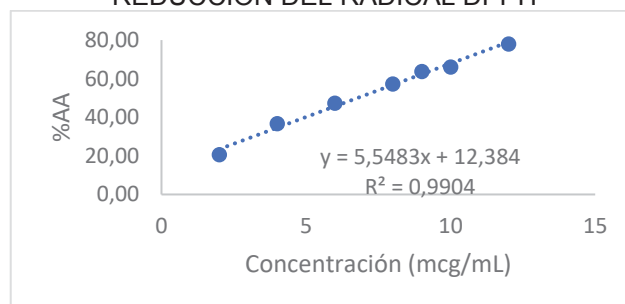
Para la evaluación de los resultados de este análisis fueron calculados los porcentajes de inhibición del DPPH y por regresión lineal fue posible calcular el IC_{50} , que es la concentración de la muestra que reduce el 50% de la concentración inicial del DPPH. Las muestras fueron comparadas con los patrones BHT, Rutina y Vitamina C. En los GRÁFICOS 6 hasta el GRÁFICO 18 se muestran cada una de las curvas que se utilizaron para la determinación de los IC_{50} , de los patrones ya mencionados, así como también, para cada uno de los extractos brutos, fracciones y aceite esencial de la especie *A. semidentatus*.

GRÁFICO 6 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRÓN BHT POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



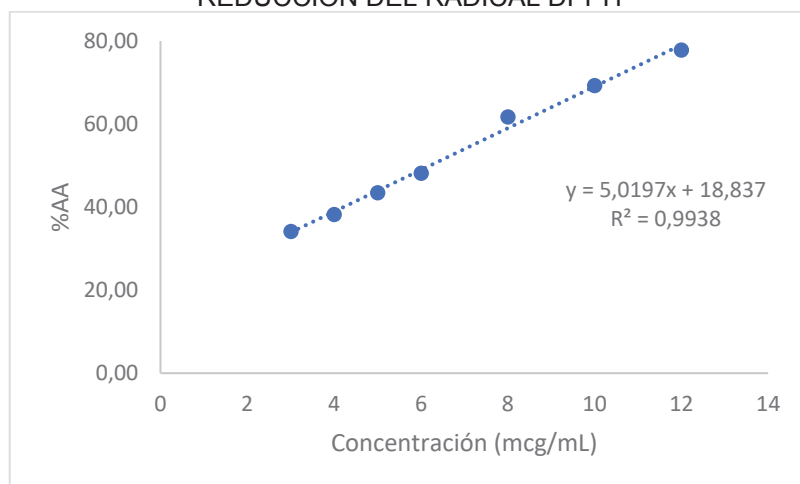
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 7 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRÓN RUTINA POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



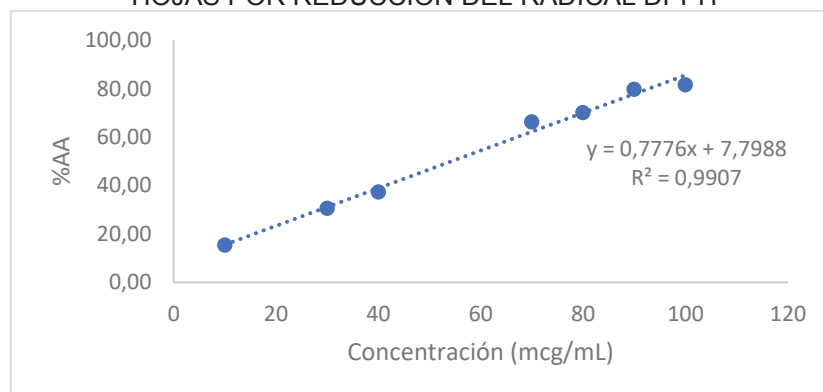
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 8 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRÓN VITAMINA C POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



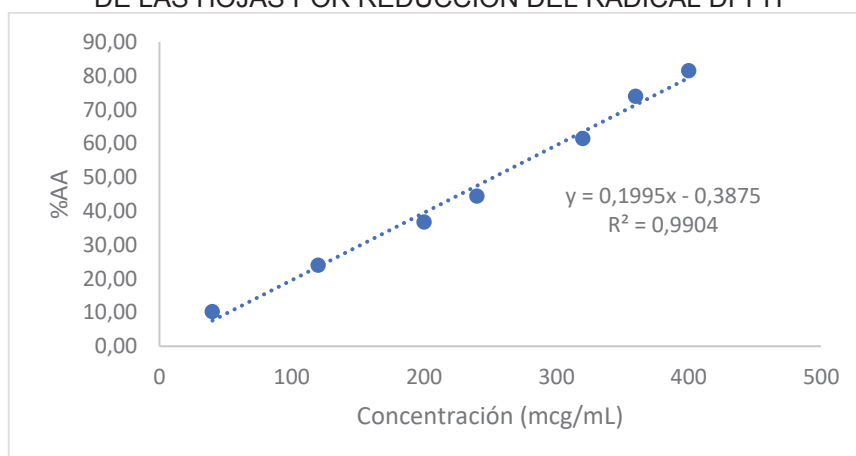
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 9 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



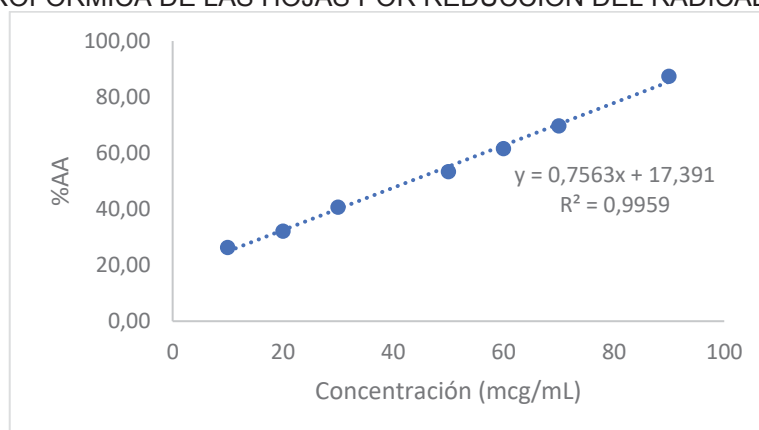
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 10 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN HEXANÓLICA DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



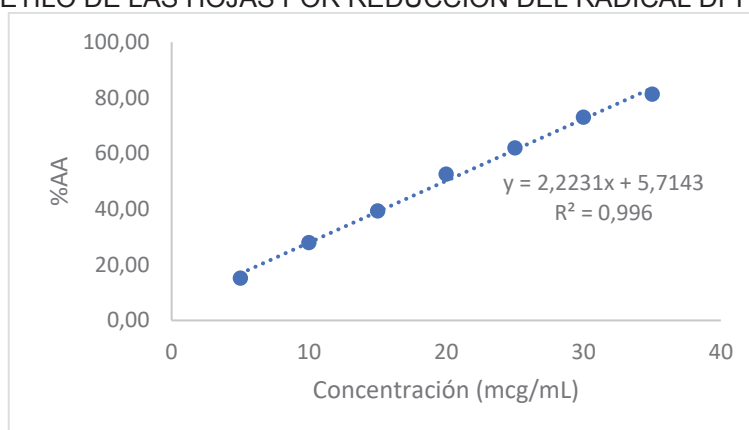
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 11 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



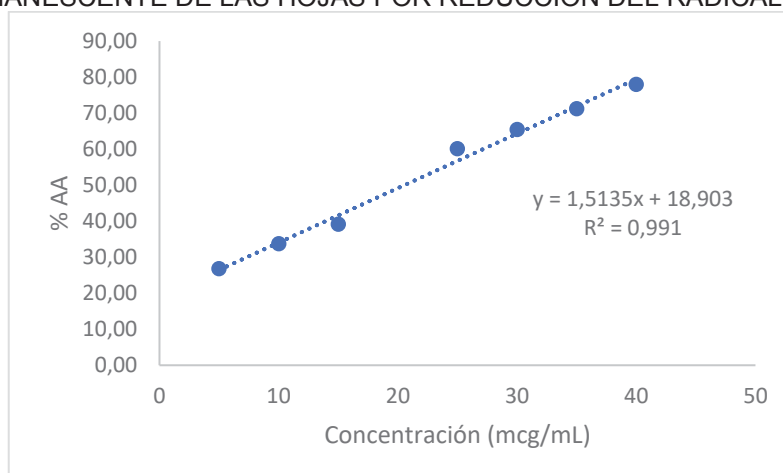
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 12 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



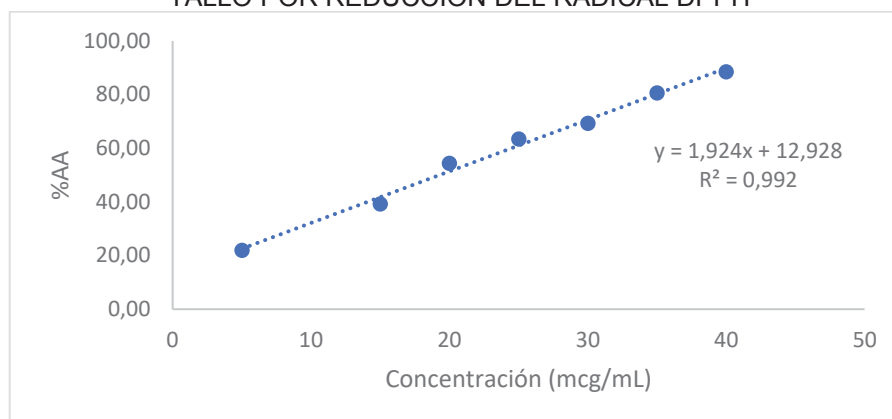
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 13 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN REMANESCENTE DE LAS HOJAS POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



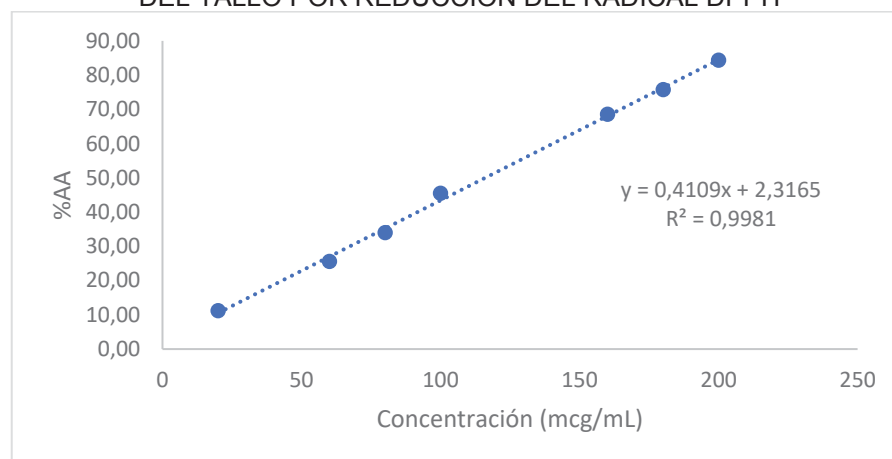
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 14 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO BRUTO DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



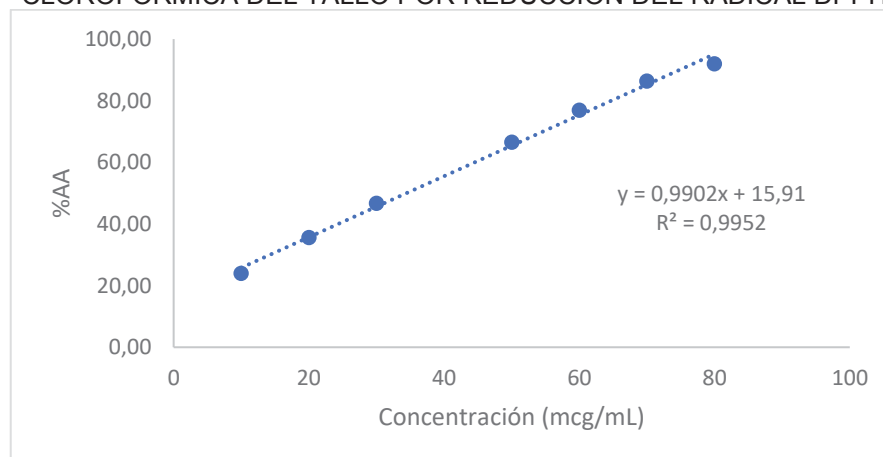
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 15 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN HEXANÓLICA DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



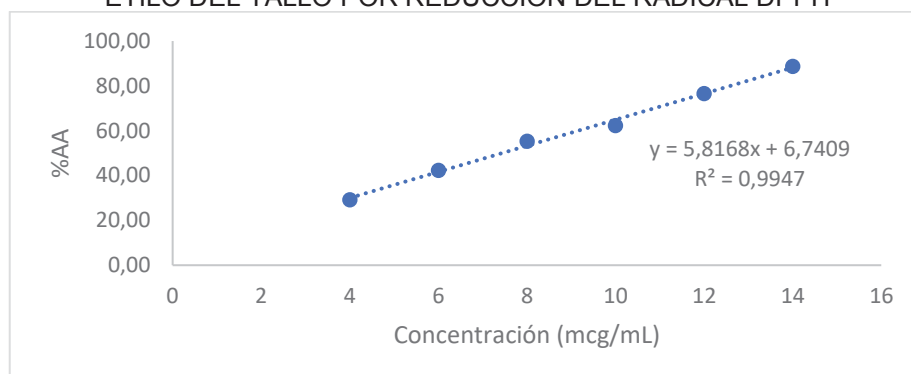
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 16 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



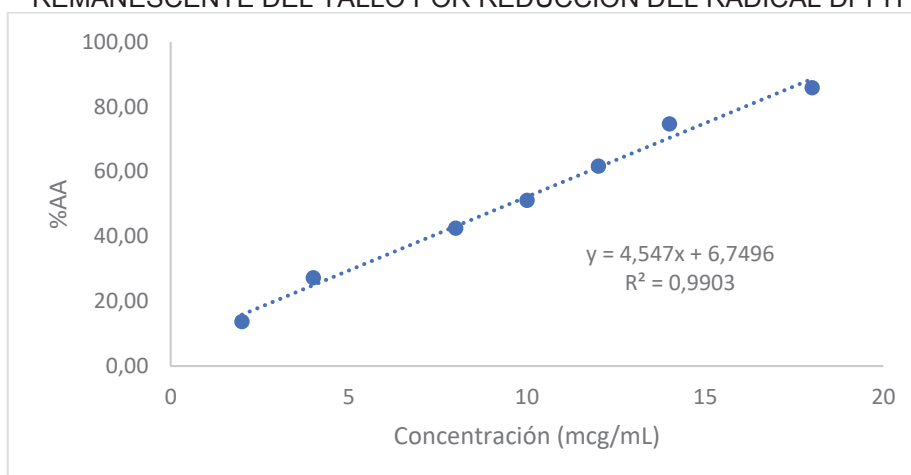
FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 17 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN ACETATO DE ETILO DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 18 – CURVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN REMANESCENTE DEL TALLO POR REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



FUENTE: EL AUTOR (2018)

A partir de cada curva de calibración se procedió a determinar el valor de IC_{50} , el cual no es mas que, la concentración necesaria del extracto bruto o fracción necesaria para reducir el 50% de la concentración inicial del reactivo DPPH. Estos valores se muestran en la TABLA 13, y para una mejor visualización, los valores de IC_{50} obtenidos, son comparados entre sí y se muestran en el GRÁFICO 19.

TABLA 13 – ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH DE LOS EXTRACTOS BRUTOS, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *A. Semidentatus*

MUESTRA	IC ₅₀ µg/mL ± Desv. Est.	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
HOJAS		
EB	54,27 ± 1,55	a3
FH	252,57 ± 4,41	a4
FC	43,12 ± 1,76	a2
FAE	19,92 ± 0,27	a1
FR	20,55 ± 1,68	a1
AE	-----	---
TALLO		
EB	19,27 ± 0,17	a2
FH	116,05 ± 2,12	a4
FC	34,33 ± 0,84	a3
FAE	7,44 ± 0,23	a1
FR	9,51 ± 0,14	a1
PATRONES		
BHT	8,55 ± 0,05	a1
RUTINA	6,78 ± 0,03	a1
VITAMINA C	6,21 ± 0,01	a1

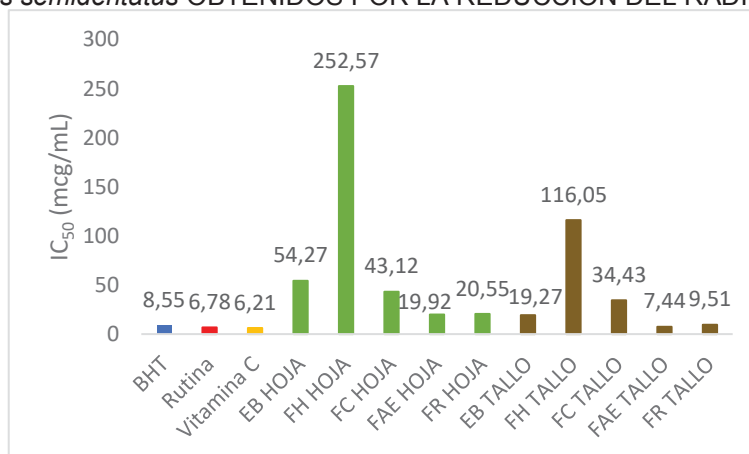
FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR) y Aceite esencial. (AE).

En el GRÁFICO 19 podemos observar los diferentes valores de IC₅₀ para cada uno de los extractos y fracciones de la especie *A. semidentatus*.

GRÁFICO 19 - GRÁFICO COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES VALORES DE IC₅₀ DE *Allophylus semidentatus* OBTENIDOS POR LA REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH



FUENTE: EL AUTOR (2018)

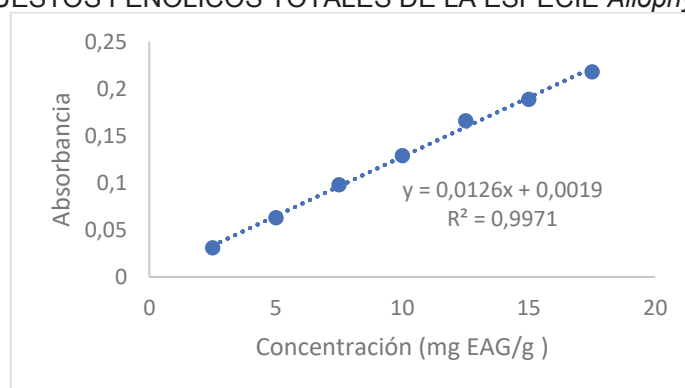
Todos los extractos y fracciones fueron comparados con los patrones de BHT, Rutina y Vitamina C, en donde las fracciones con los valores mas cercanos al IC₅₀ de los patrones, fue la fracción de acetato de etilo del tallo, con 7,44µg/mL. Este resultado concuerda con los resultados del estudio fitoquímico del extracto acuoso al 20%, el cual resulto reacción positiva para la prueba de determinación de flavonoides, que como sabemos son los metabolitos responsables por la acción antioxidante.

En relación al cálculo del IC₅₀ del aceite esencial, este no se pudo determinar, ya que para realizar dicha determinación se necesitaría una gran cantidad del aceite y el IC₅₀ sería mayor al 1000µg/mL.

6.9.3.3 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos

Se procedió a realizar la curva de calibración del ácido gálico la cual podemos observar en el GRÁFICO 20.

GRÁFICO 20 – CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*.



FUENTE: EI AUTOR (2018)

Los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración se muestran en la TABLA 14.

TABLA 14 - CANTIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (EQUIVALENTES EN ÁCIDO GÁLICO-EAG) EN LOS EXTRACTOS BRUTOS, FRACCIONES Y ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *A. semidentatus*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES (mg EAG/g DE MUESTRA)	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
Hojas		
EB	21,09 ± 0,23	a2
FH	-----	
FC	22,55 ± 0,14	a3
FAE	37,47 ± 0,29	a7
FR	38,79 ± 0,20	a5
AE	30,17 ± 0,29	a2
Tallo		
EB	23,84 ± 0,29	a6
FH	-----	
FC	20,85 ± 0,44	a6
FAE	135,06 ± 0,44	a8
FR	76,86 ± 0,36	a1

FUENTE: EI AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanescente (FR) y Aceite esencial (AE).

Según Chew et al. (2011) las concentraciones de fenoles por encima de 50 mg.EAG/g es considerada como alta, entre 50 y 30mg.EAG/g, es considerado media-alta. De acuerdo con esta clasificación podemos decir que, la fracción acetato de etilo presentó una alta concentración de $135,06 \pm 0,44$ mg EAG/g y la fracción remanesciente presentó una concentración también alta de $76,86 \pm 0,36$ mg EAG/g. Algunos de los compuestos que reaccionan con el compuesto folin ciocalteau son: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, fenoles simples, lignanos, taninos hidrolizables y condensados (BLAINSKI et al., 2013).

Las altas concentraciones de fenoles totales encontradas en la fracción acetato de etilo del tallo, concuerdan con los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante y los resultados del estudio fitoquímico. La fracción hexanólica no fue analizada, debido a que después del tiempo de reacción esta se tornó turbia.

En relación al contenido de compuestos fenólicos totales del aceite esencial, lo podemos considerar como medio ya que el valor obtenido fue de $30,17 \pm 0,29$ mg EAG/g.

6.9.3.4 Actividad alelopática

La alelopatía está definida como la capacidad directa de un compuesto químico liberado por una planta sobre el desarrollo y crecimiento de otra planta. Es un hecho conocido que sustancias alelopáticas son inducidas por estrés ambientales como por ejemplo; alta luz UV, hiriendo la planta y/o por ataques de agentes patógenos. Estos compuestos alelopáticos pueden ser liberados de las plantas al ambiente por exudación de las raíces, lixiviación, volatilización y descomposición de los residuos de las plantas en el suelo (FERREIRA, 2000)

De esta forma, este trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad alelopática del extracto bruto y de las fracciones obtenidas de las hojas y el tallo de la especie *Allophylus semidentatus*, específicamente la influencia en la germinación y el crecimiento.

6.9.3.4.1 Germinación

El análisis de los efectos alelopáticos de la especie *Allophylus semidentatus* (TABLA 15), indicaron que no hubo interferencia (estadísticamente significativa al ser comparados con los controles) en las semillas de la *Lactuca sativa* que estuvieron en contacto con los diferentes extractos y fracciones. Al observar los resultados de las fracciones del tallo, podemos notar que no hubo inhibición en el porcentaje de germinación de la *Lactuca sativa* (lechuga). En los GRÁFICOS 21 y 22, podemos observar los resultados de germinación, tanto para las fracciones de las hojas y tallo, respectivamente.

TABLA 15 – INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, en la germinación de la *Lactuca sativa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/mL)	PROMEDIO DE GERMINACIÓN	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
HOJAS			
EB	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	5,00	a1
	1000	4,75	a1
FH	100	4,75	a1
	250	5,00	a1
	500	4,75	a1
	750	5,00	a1
	1000	4,67	a1
FC	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	5,00	a1
	1000	4,75	a1
FAE	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	4,75	a1
	1000	5,00	a1
FR	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	5,00	a1
	1000	5,00	a1
AGUA	---	5,00	a1
METANOL	---	5,00	a1
TALLO			
EB	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	4,75	a1
	1000	5,00	a1
FH	100	5,00	a1
	250	4,75	a1
	500	4,75	a1
	750	5,00	a1
	1000	5,00	a1

TABLA 15 – INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, en la germinación de la *Lactuca sativa*.

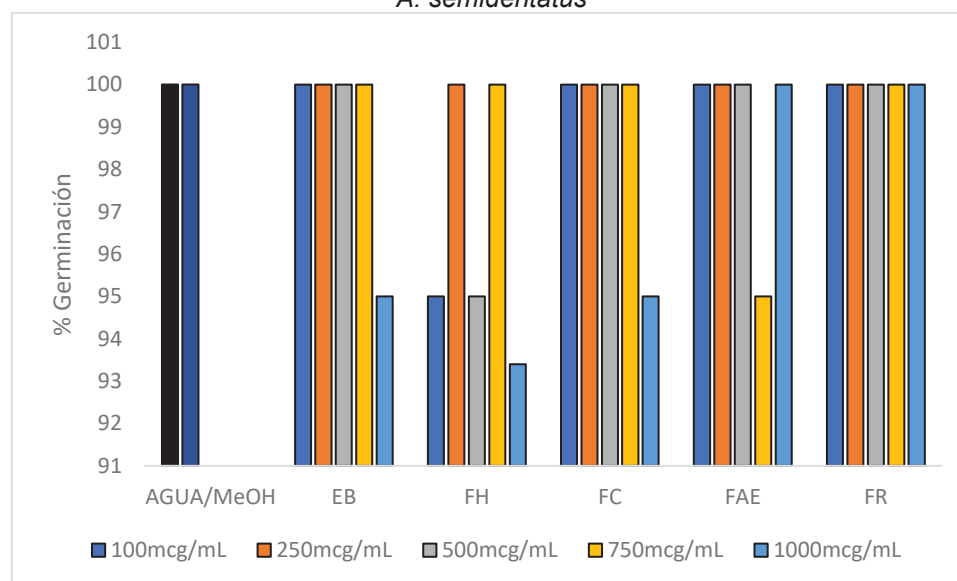
(continuación)			
FC	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	5,00	a1
	1000	5,00	a1
FAE	100	5,00	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	5,00	a1
	1000	5,00	a1
FR	100	4,75	a1
	250	5,00	a1
	500	5,00	a1
	750	4,75	a1
	1000	4,75	a1
AGUA	---	5,00	a1
METANOL	---	5,00	a1

FUENTE: EI AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanescente (FR).

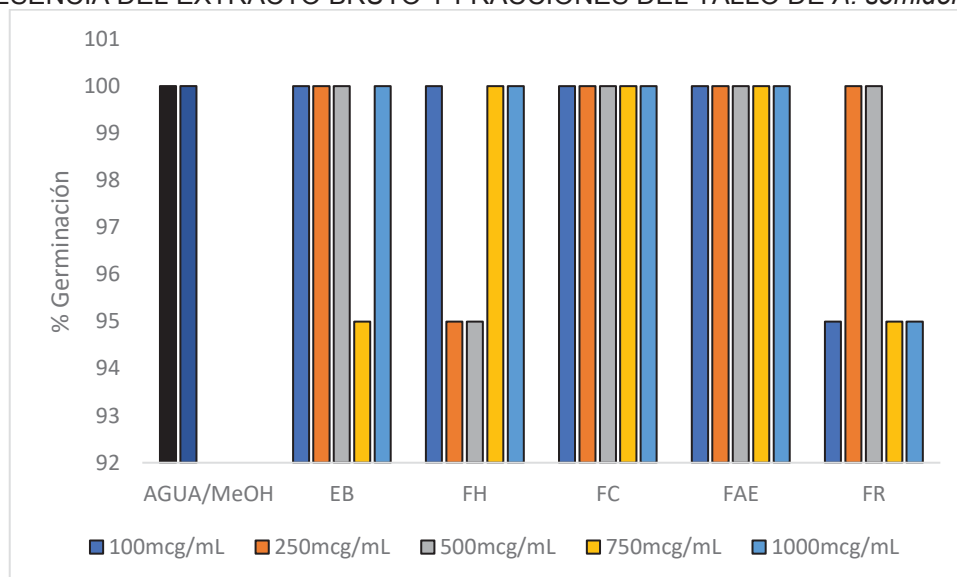
GRÁFICO 21 - PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE *A. semidentatus*



FUENTE: EI AUTOR (2018)

NOTA: Metanol (MeOH), Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanescente (FR).

GRÁFICO 22 - PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *L. sativa* EN PRESENCIA DEL EXTRACTO BRUTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE *A. semidentatus*



FUENTE: EI AUTOR (2018)

NOTA: Metanol (MeOH), Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR).

En la TABLA 16, se observa la influencia del aceite esencial de la hojas de la especie *Allophylus semidentatus*, en la germinación de la semilla de *Lactuca sativa*.

TABLA 16 – INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, en la germinación de la *Lactuca sativa*.

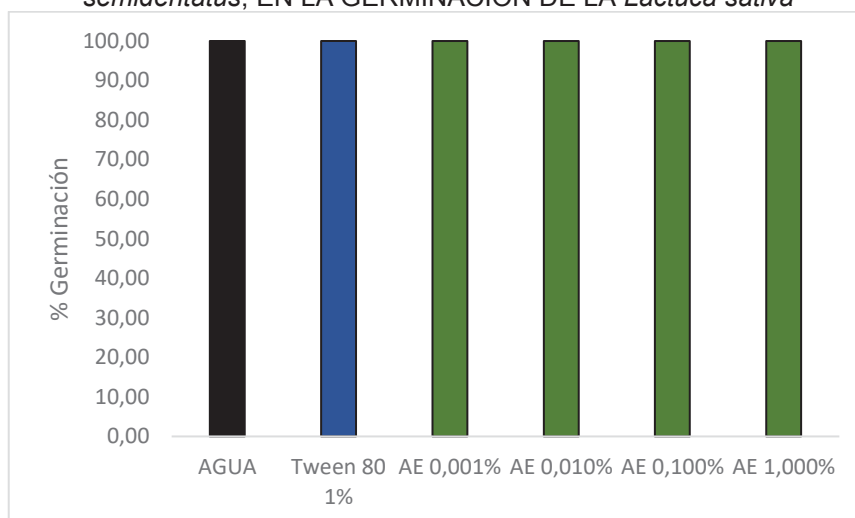
MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (%)	PROMEDIO DE GERMINACIÓN	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
Aceite esencial	0,001	5	a1
	0,010	5	a1
	0,100	5	a1
	1,000	5	a1
Agua	---	5	a1
Tween 80	1%	5	a1

FUENTE: EI AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

En el GRÁFICO 23, se observa que no hubo influencia en la germinación de las semillas de la *Lactuca sativa* por parte del aceite esencial extraído de las hojas de *Allophylus semidentatus*.

GRÁFICO 23 – INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, EN LA GERMINACIÓN DE LA *Lactuca sativa*



FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Aceite esencial (AE).

6.9.3.4.2 Crecimiento radicular

El sistema radicular es mucho mas sensible a la acción de los compuestos aleloquímicos que puedan contener los extractos y fracciones que las partes aéreas de acuerdo con Hoffmann, et. al. (2007). Esto tiene mucho sentido, ya que el tiempo de contacto de las raíces con los aleloquímicos es mucho mayor que el tiempo que permanece cualquier parte aérea de la planta con estos mismos compuestos. En la TABLA 17, podemos observar la influencia de los extractos y fracciones de la especie *Allophylus semidentatus* en el crecimiento de la radícula de la *Lactuca sativa*.

TABLA 17 – INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, EN EL CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/mL)	PROMEDIO DE RADÍCULA (mm)	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
HOJAS			
EB	100	24,05	a1 a2 a3 a4
	250	23,00	a1 a2 a3
	500	28,50	a2 a3 a4 a5 a6
	750	24,25	a1 a2 a3 a4
	1000	28,80	a2 a3 a4 a5 a6
FH	100	36,35	a1 a2 a3 a4 a5
	250	25,00	a1 a2 a3 a4
	500	28,10	a2 a3 a4 a5 a6
	750	28,10	a2 a3 a4 a5 a6
	1000	35,25	a6
FC	100	18,00	a1
	250	21,80	a1 a2
	500	19,30	a1
	750	29,75	a2 a3 a4 a5 a6
	1000	29,80	a2 a3 a4 a5 a6
FAE	100	29,50	a2 a3 a4 a5 a6
	250	31,60	a4 a5 a6
	500	25,00	a1 a2 a3 a4
	750	30,50	a3 a4 a5 a6
	1000	31,65	a4 a5 a6
FR	100	29,65	a2 a3 a4 a5 a6
	250	34,05	a5 a6
	500	34,80	a6
	750	32,15	a4 a5 a6
	1000	36,45	a6
AGUA	---	36,20	a6
METANOL	---	36,20	a6
TALLO			
EB	100	25,00	a1 a2 a3 a4
	250	26,00	a1 a2 a3 a4
	500	26,75	a1 a2 a3 a4
	750	28,70	a1 a2 a3 a4 a5
	1000	32,10	a3 a4 a5
FH	100	20,25	a1
	250	26,40	a1 a2 a3 a4
	500	24,40	a1 a2 a3
	750	29,95	a2 a3 a4 a5
	1000	25,40	a1 a2 a3 a4
FC	100	23,90	a1 a2 a3
	250	25,40	a1 a2 a3 a4
	500	21,45	a1 a2
	750	20,10	a1
	1000	25,45	a1 a2 a3 a4
FAE	100	31,45	a3 a4 a5
	250	31,00	a3 a4 a5
	500	32,05	a3 a4 a5
	750	34,10	a4 a5 a6
	1000	31,05	a3 a4 a5

TABLA 17 – INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, EN EL CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*.

(continuación)			
FR	100	41,70	a5 a6
	250	23,65	a1 a2 a3
	500	27,00	a1 a2 a3 a4
	750	30,60	a2 a3 a4 a5
	1000	36,80	a5 a6
AGUA	---	49,00	a7
METANOL	---	49,60	a7

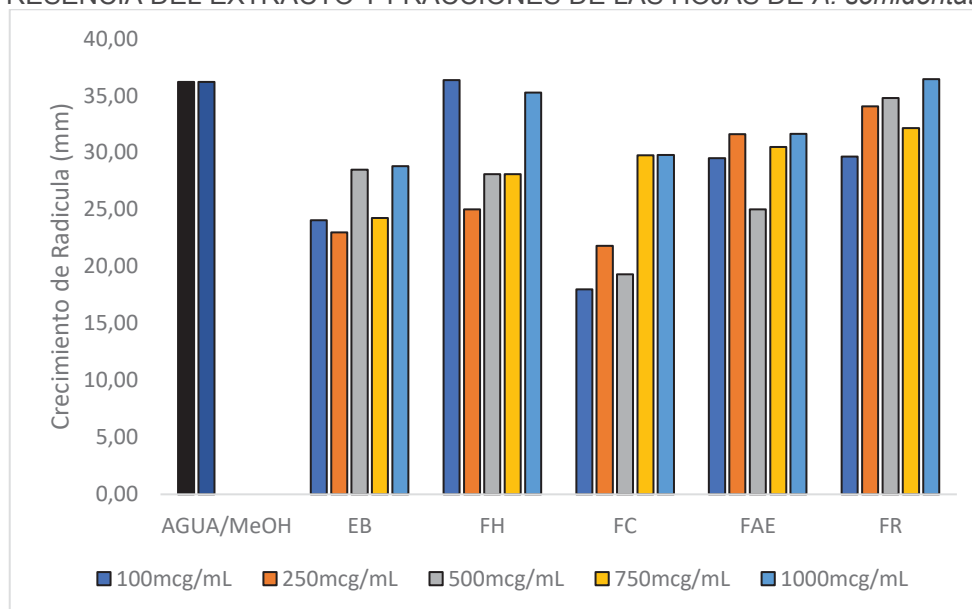
FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR).

En los GRÁFICOS 24 Y 25, se puede observar mas claramente la influencia negativa o inhibición del crecimiento por parte de los extractos y fracciones de la especie *Allophylus semidentatus* en las semillas de *Lactuca sativa*. En el caso de la fracción de cloroformo es conocido que uno de los principales metabolitos secundarios, que ahí se encuentran, son los alcaloides, los cuales son conocidos por ser inhibidores del crecimiento cuando se evalua actividad alelopática.

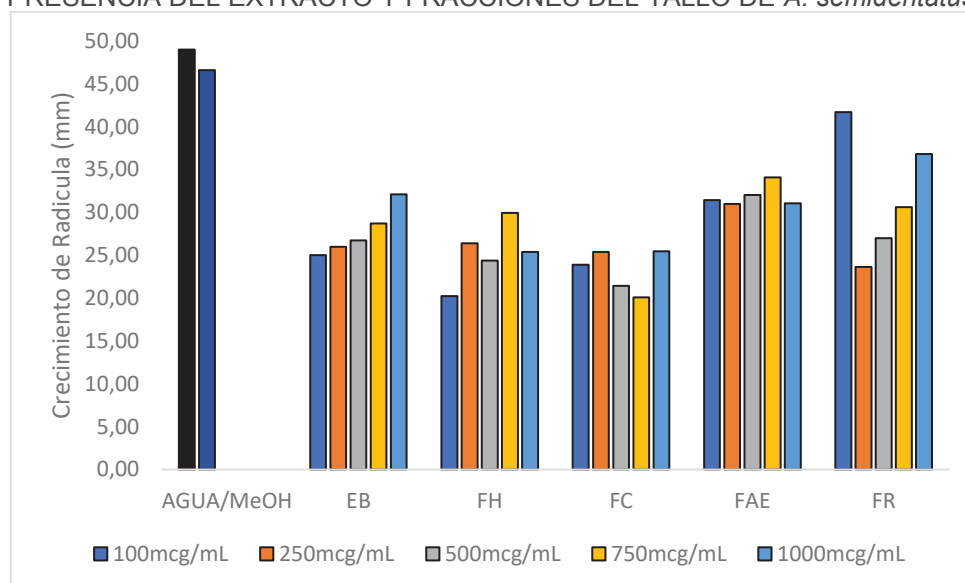
GRÁFICO 24 - CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE *A. semidentatus*.



NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR).

FUENTE: EL AUTOR (2018)

GRÁFICO 25 - CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE *A. semidentatus*.



NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR).

FUENTE: EL AUTOR (2018)

Los resultados de la influencia del aceite esencial de las hojas de la especie *Allophylus semidentatus* se observan en la TABLA 18.

TABLA 18 – INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, EN EL CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA *Lactuca sativa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (%)	PROMEDIO DE RADÍCULA (mm)	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
Aceite esencial	0,001	31,25	a1
	0,010	27,75	a1
	0,100	34,28	a1
	1,000	29,32	a1
Agua	---	34,16	a1
Tween 80	1%	34,46	a1

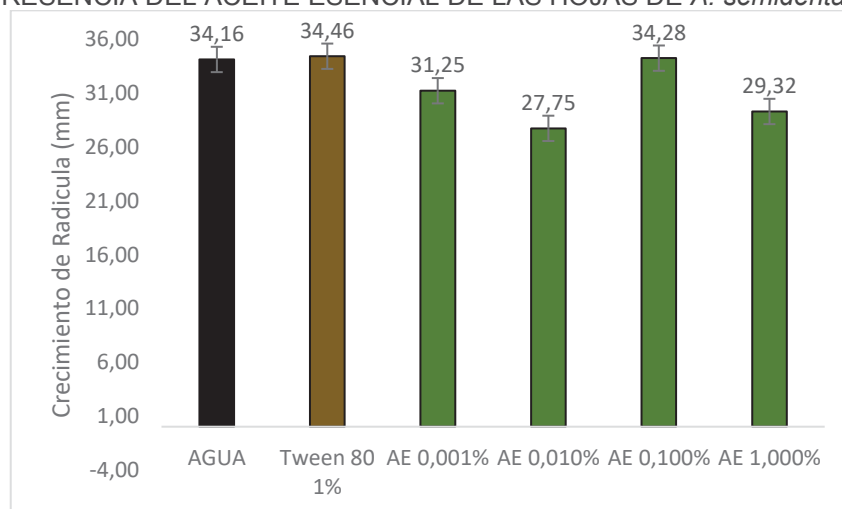
* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR).

FUENTE: EL AUTOR (2018)

En el GRÁFICO 26, se muestran los resultados de la influencia ligeramente negativa o inhibitoria del aceite esencial de las hojas de la especie *Allophylus semidentatus* en el crecimiento de la radícula de *Lactuca sativa*.

GRÁFICO 26 - CRECIMIENTO DE LA RADÍCULA DE SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *A. semidentatus*



FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Aceite esencial (AE).

6.9.3.4.3 Crecimiento del hipocótilo

Para la verificación del crecimiento del hipocótilo, se midió el tamaño del mismo después de 7 días de almacenamiento en la estufa. En la TABLA 19, podemos observar los resultados de los extractos y fracciones de las hojas de la especie *Allophylus semidentatus*.

TABLA 19 – INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, en el crecimiento del hipocótilo de la *Lactuca sativa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/mL)	PROMEDIO DEL HIPOCÓTILO (mm)	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
HOJAS			
EB	100	43,15	a1 a2 a3
	250	36,80	a1
	500	41,75	a1 a2 a3
	750	38,20	a1 a2
	1000	40,15	a1 a2 a3
FH	100	34,65	a1
	250	36,35	a1
	500	37,05	a1
	750	40,25	a1 a2 a3
	1000	40,65	a1 a2 a3
FC	100	39,85	a1 a2 a3
	250	41,25	a1 a2 a3
	500	39,95	a1 a2 a3
	750	43,65	a1 a2 a3
	1000	39,95	a1 a2 a3
FAE	100	40,50	a1 a2 a3
	250	41,35	a1 a2 a3
	500	35,90	a1
	750	35,10	a1
	1000	36,30	a1

TABLA 19 – INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, en el crecimiento del hipocótilo de la *Lactuca sativa*.

(continuación)

FR	100	50,00	a3
	250	49,45	a2 a3
	500	49,20	a2 a3
	750	41,50	a1 a2 a3
	1000	42,10	a1 a2 a3
AGUA	---	42,25	a1 a2 a3
METANOL	---	40,05	a1 a2 a3
TALLO			
EB	100	35,85	a2 a3 a4
	250	32,70	a1 a2 a3 a4
	500	31,70	a1 a2 a3 a4
	750	32,85	a1 a2 a3 a4
	1000	34,60	a1 a2 a3 a4
FH	100	25,80	a1
	250	28,90	a1 a2 a3 a4
	500	26,55	a1 a2
	750	31,05	a1 a2 a3 a4
	1000	32,10	a1 a2 a3 a4
FC	100	32,25	a1 a2 a3 a4
	250	30,15	a1 a2 a3 a4
	500	27,55	a1 a2 a3
	750	28,10	a1 a2 a3 a4
	1000	28,15	a1 a2 a3 a4
FAE	100	29,15	a1 a2 a3
	250	32,90	a1 a2 a3 a4
	500	29,00	a1 a2 a3 a4
	750	33,40	a1 a2 a3 a4
	1000	32,45	a1 a2 a3 a4
FR	100	51,95	a5
	250	37,20	a4
	500	31,95	a1 a2 a3 a4
	750	34,40	a1 a2 a3 a4
	1000	36,50	a3 a4
AGUA	---	48,75	a5
METANOL	---	49,85	a5

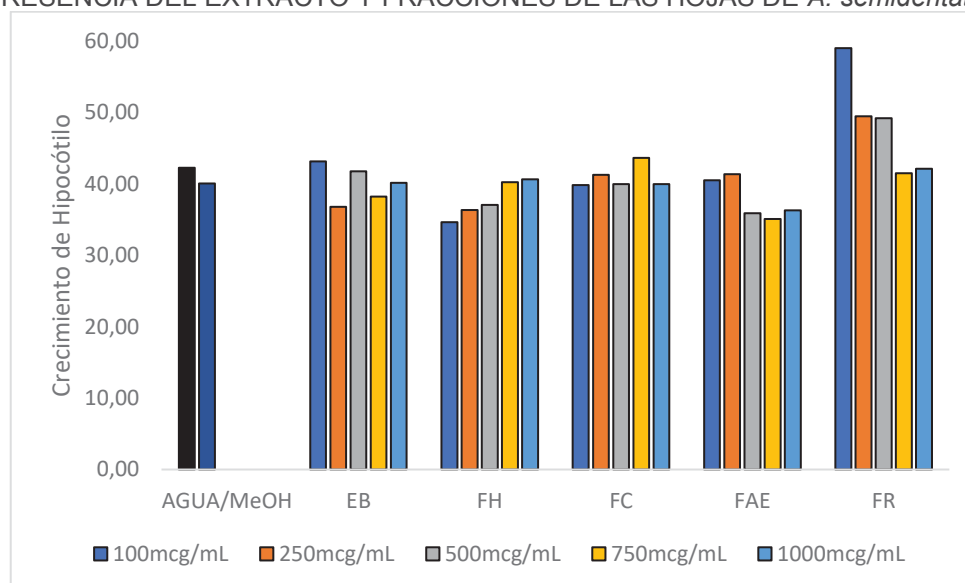
FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente

NOTA: Extracto bruto (EB), Fracción hexanólica (FH), Fracción clorofórmica (FC), Fracción de acetato de etilo (FAE), Fracción remanesciente (FR).

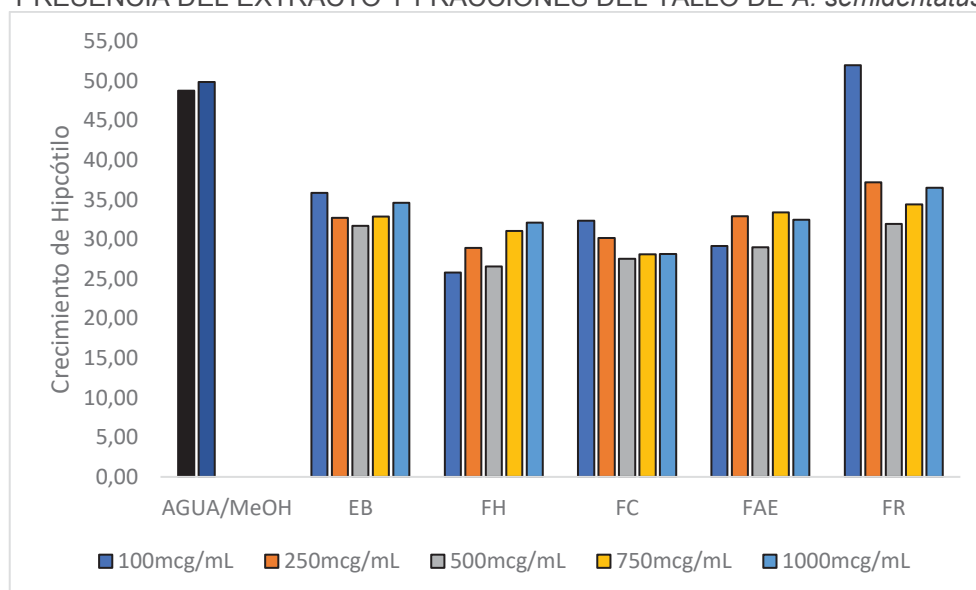
En el GRÁFICO 27, podemos observar que la fracción remanesciente del tallo, en la concentración de 100µg/ML, influyó positivamente en el crecimiento del hipocótilo de la *Lactuca sativa*, mientras que el GRÁFICO 28, todas las fracciones presentaron una influencia negativa en el crecimiento del hipocótilo de la *Lactuca sativa* (estadísticamente significativa al ser comparados con los controles)

GRÁFICO 27 - CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE *A. semidentatus*.



FUENTE: EI AUTOR (2018)

GRÁFICO 28 - CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL EXTRACTO Y FRACCIONES DEL TALLO DE *A. semidentatus*



FUENTE: EI AUTOR (2018)

En la TABLA 20, se observan los resultados de la influencia del aceite esencial de las hojas de la especie *Allophylus semidentatus*.

TABLA 20 – INFLUENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Allophylus semidentatus*, EN EL CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*.

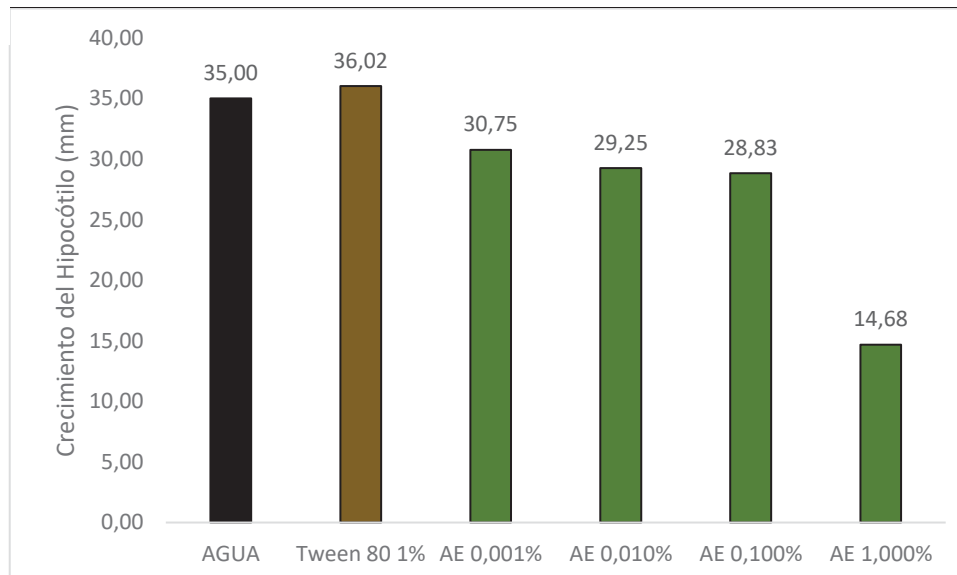
MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (%)	PROMEDIO DE HIPOCÓTILO (mm)	CLASIFICACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY*
Aceite esencial	0,001	30,75	a2 a3 a4
	0,010	29,25	a2 a3
	0,100	28,83	a2
	1,000	14,68	a1
Agua	---	35,00	a3 a4
Tween 80	1%	36,02	a4

FUENTE: EL AUTOR (2018)

* Muestras clasificadas en el mismo grupo no difieren estadísticamente.

En el GRÁFICO 29, se muestran los resultados de la influencia negativa o inhibitoria del aceite esencial de las hojas de la especie *Allophylus semidentatus* en el crecimiento de la radícula de *Lactuca sativa*, el cual es dosis dependiente, es decir, a mayor concentración la inhibición en el crecimiento de la radícula fue mayor.

GRÁFICO 29 - CRECIMIENTO DEL HIPOCÓTILO DE SEMILLAS DE *L. sativa* (LECHUGA) EN PRESENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *A. semidentatus*



FUENTE: EL AUTOR (2018)

NOTA: Aceite esencial (AE).

CONCLUSIONES

La especie *Allophylus semidentatus*, pertenece a la familia Sapindaceae, la cual no presenta descripción en la literatura sobre su composición fitoquímica, ni otro estudio relacionado. En esta investigación se obtuvo el permiso de investigación por parte del IBAMA bajo el nº 02001.001165/2013-47. Las hojas y tallos fueron colectados de tres individuos en el Capão do Cifloma, localizado en el Campus Jardim Botânico de la Universidad Federal do Paraná, municipio de Curitiba, Paraná, Brasil. Se procesaron 1565 g de hojas y 2344 g de tallos, los cuales presentaron un contenido de cenizas de $(7,27 \pm 0,12)\%$ para las hojas y $(3,20 \pm 0,14)\%$ para el tallo; presentaron una humedad del $(8,21 \pm 0,12)\%$ y $(5,83 \pm 0,02)\%$, respectivamente. En el estudio fitoquímico preliminar esta especie evidenció la presencia de los siguiente grupos fitoquímicos: alcaloides, flavonoides, cumarinas, iridoides, esteroides y/o triterpenos, polifenoles.

Se determinó el porcentaje de rendimiento de todas las fracciones, en donde el mayor porcentaje lo presentó la fracción remanesciente del tallo con un valor del 2,73%. Se realizó la extracción del aceite esencial de las hojas obteniéndose un 0,73% de rendimiento. La caracterización física del aceite esencial dio como resultado una densidad relativa de $0,921 \pm 0,006$, un índice de refracción de 1,503 a una temperatura de 28 °C y diferentes valores de solubilidad en etanol dependiendo de la concentración. El aceite esencial se analizó por CG/EM dando como resultado los compuestos mayoritarios el γ -Muurolene (25,52%), δ -Cadinene (7,64%) y el Z-Caryophyllene (6,49%). Se realizó la cromatografía de columna abierta para la fracción hexano del tallo, lográndose aislar e identificar el compuesto 3-oxo-friedelano (Friedelina). El compuesto 2,5-dioxo-4-imidazolidinil urea (Alantoína) se obtuvo al momento de realizar el fraccionamiento con cloroformo del tallo.

En la actividad tóxica *in vitro*, las fracciones hexanólica (722,87 $\mu\text{g/mL}$) y acetato de etilo (888,73 $\mu\text{g/mL}$), presentaron una actividad levemente tóxica frente a la *Artemia salina*. En cuanto a la actividad hemolítica de los extractos, fracciones y aceite esencial solo la fracción hexanólica de las hojas presentó una hemólisis de alrededor del 60%, en una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

En relación a la actividad antioxidante a través el método de formación del complejo fosfomolibdeno, el aceite esencial presentó la mayor actividad

antioxidante en comparación a los patrones BHT, Rutina y Vitamina C, seguido por la fracción acetato de etilo del tallo. En cuanto al método de reducción del radical DPPH, la fracción que presentó un valor de IC_{50} similar al de los patrones utilizados fue nuevamente la fracción de acetato de etilo del tallo, mientras que el valor de IC_{50} del aceite esencial no fue posible calcularlo. En relación al ensayo de compuestos fenólicos totales, nuevamente quién presento un alto valor fue la fracción de acetato de etilo del tallo ($135,06 \pm 0,44$ mg EAG/g), mientras que el aceite esencial presentó un valor de ($30,17 \pm 0,29$ mg EAG/g).

En el estudio de la actividad alelopática de los extractos, fracciones y el aceite esencial se evidenció, en la mayoría de los casos, una inhibición en el crecimiento de la radícula e hipocótilo de la *Lactuca sativa*.

CONSIDERACIONES FINALES

Algunos géneros de la familia Sapindaceae son conocidos por sus propiedades biológicas, usos en los diferentes ramos de la industria, así como también sus usos populares. Los estudios del género *Allophylus* son de gran importancia, ya que existen diversas investigaciones que revelan las propiedades biológicas de este género.

Los estudios de la especie *Allophylus semidentatus* son inéditos, en este trabajo se mostraron los resultados de algunas actividades biológicas e antioxidantes, debido a estos resultados, se recomienda continuar la la investigación química de esta especie. Considerando la presencia de Alantoína, la cual tiene como principal actividad la cicatrizante, sin causar ningún efecto tóxico, se recomienda realizar el estudio del uso de la alantoína en el tratamiento de úlceras gástricas, ya que hasta el momento nunca ha sido estudiado.

Adicionalmente se sugiere el estudio de la fracción clorofórmica de las dos partes morfológicas estudiadas con la finalidad de aislar e identificar constituyentes químicos que puedan presentar mayor potencial en los métodos estudiados.

REFERENCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass spectrometry**. 4. ed. Carol stream IL: Allured Publishing, 2007.
- ALMEIDA, V.L. *et al.*,. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím Nova**, v.28, n.1, São Paulo, jan-fev, 2005.
- ARAGÃO, P.C.A., *et al.*, Substâncias isoladas de *Byrsonima Variabilis*. **Quím Nova**. v. 13, n.4, p.254-259, 1990.
- ARAUJO, L.U., GRABE-GUIMARAES, A., MOSQUEIRA, V.C., *et al.*, 2010. **Profile of wound healing process induced by allantoin**. Acta Cir. Bras. 25, 460–466.
- ARNON, D. I., Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. **Plant Physiology**. V. 24, n. 1, 1949.
- ASSIS, P., THEODORO, P., PAULA, J., ARAÚJO, A. **Antifungal ether diglycosides from *Matayba guianensis* Aublet**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24. P. 1414–1416. 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.
- BARNES, J. P., PUTNAN, A. R., BURKE, B.A., AASEN, A. J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v 26 n. 5 p. 1385-1390, 1987
- BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976
- BIANCO. E. M., SANTOS, C. A. M., Substâncias isoladas das folhas de *Buhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2 p. 93-99, 2003.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. **Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L.** **Molecules**, n. 18, p. 6852-6865, 2013.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª Edição, Volume 1. Agência Nacional de Vigilância. 2010

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para a Análise de Sementes. 399 p. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S.A., 1991. 594 p.

CABIESES, F. **Apuntes de medicina tradicional: La racionalización de lo irracional**. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima-Perú. P. 7-8, 2000.

CAHEN, R., CLEMENT, J.F., 1962. **Pharmacological study of dihydroxyaluminum allantoinate and chlorhydroxyaluminum allantoinate and chlorhydroxyaluminum allantoinate**. II. Study of the gastric activity. Ann. Pharm. Fr. 20, 693–703.

CARVALHO, J. L. DE C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e Analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**, 2001

CHEN, M.F., TSAI, J.T., CHEN, L.J., et al., 2014. **Antihypertensive action of allantoin in animals**. BioMed. Res. Int. 14, 1–6.

CHON, S. U.; JANG, H. G.; KIM, D. K.; KIM, Y. M.; Boo, H. O.; KIM, Y. J. allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 3, p. 309-317, 2005.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. **Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia**. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 11, n. 12, 2011

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDART INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Aprovado standart – Eight edition. M7 – A8, 2009.

DIAS, J. DE F. G; CIRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribution to the allelopathic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmagconosia**, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.

ELIZAGARAY, B.; CASTRO, R. Producción científica cubana sobre plantas medicinales y productos naturales a partir de la base de datos PlantMedCUBA, 1967-2010. **Revista cubana de plantas medicinales** p. 348-360 2013

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. p. 263-288.

FERREIRA D, ALVARES P, HOUGHTON P, BRAZ-FILHO R. **Constituintes químicos das raízes de *pyrostegia venustae* considerações sobre a sua importância medicinal**. Quim. Nova. 26(1):42-46. 2000.

- FLORENTINO, I.F., SILVA, D.P.B., GALDINO, P.M., et al., 2016. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice.** J. Ethnopharmacol. 186, 298–304.
- FOGLIANI, B., RAHARIVELOMANANA, P., BIANCHINI, J. **Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia.** Phytochemistry 66 P. 241–247. 2005.
- FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and applications.** John Wiley & Sons, p. 108-309, 1989.
- GACHET, M., KAISER, M., BRUN, R., ZEHL, M., KELLER, W., **Antiparasitic Compounds from *Cupania cinerea* with activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*.** 74, p. 559–566. 2011.
- GUARIM NETO, G., SANTANA, R. S., SILVA, J. V., **Notas Etnobotânicas de *Sapindaceae*.** Acta Botânica Brasilica. 14. P. 327-334. 2000
- HARRINGTON, M. G., EDWARDS, K. J., JOHNSON, M. W., GADEK, P.A.; **Phylogenetic inference sensu lato using plastid matk and rbcL DNA sequences.** Systematic Botany. P. 366-382. 2005
- HOFMANN, B., LOTTER, H., SELIGMANN, O., WAGNER, H. **C-glycosyl flavons of antiheaptotoxic activity.** Planta Medica 58, 544–548. 1992.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique.** New York: McGraw Hill Book, 1940
- LEE, M.Y., LEE, N.H., JUNG, D., et al., 2010. **Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma.** Int. Immunopharmacol. 10, 474–480.
- LICHTENTHALER, H. K., Chlorophylls and carotenoids: pigmento f photosynthetic biomembranes. In: S.P. Colowick 6 N.O. Kaplan (eds). **Methods in Enzymology.** V. 148, pp. 350-382. Academic Press, New York, 1987
- MACIAS, F. A., CASTELLANO, D., MOLINILLO J. M. G., Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemiclas. Selection of standart target species. **Jounal Agricultural and Food Chemistry**, v 48, n. 6 p. 2512-2521, 2000
- MENSOR., L. L. et al. Screening of brazilian plant extracs for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v 15, p. 127-130, 2001
- MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Biossays for Active Plant Contituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.
- MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003
- MOREIRA, E. A. **Marcha sistemática de análise fitoquímica.** Tribuna farmacêutica. V. 47, p 1-19, 1979

MORLEY, B. *Sapindaceae*. In V.H. HEYWOOD, (ed): **Flowering plants of the World**: p. 193-194 (1998)

MUÑOZ, O. **Plantas medicinales de uso en Chile**. Química y Farmacología. Universidad de Chile. p.15-16, 2000

OLADOSU, I. A., BALOGUN, S. O., ADEMOWO G. O., **Phytochemical screening, antimalarial and histopathological studies of *Allophylus africanus* and *Tragia benthamii***, Chinese Journal of Natural Medicines, p. 371-376. 2013

OLIVEIRA, F. de.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 178 p.

PADILLA, F., RINCÓN, A., BOU-RACHED, L. **Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 58 N° 3, 2008.

PASSOS, C., RODRÍGUEZ, R., FERREIRA, C., SOARES, D. **Anti-Leishmania amazonensis activity of *Serjania lethalis* A. St.-Hil.** Parasitology International 66. P. 940–947. 2017.

PERDIZ, R. FERRUCCI, M. AMORIM, A. **Sapindaceae em remanescentes de florestas montanas no sul da Bahia, Brasil**. Disponible en: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br>. Visitado el 07/08/2016

PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

PHARMACOPEA Helvetica. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1990.

POONAM, D., PUSHPESH, K. M., RAKESH, M. VINAY, S. C., GAUTAM, P., ***Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity**. Journal Ethno-Pharmacology. p. 361-366. 2005

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M., **Spectrophotometric quantitation of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E**. Analytical Biochemistry, v. 269, p 337-341, 1999.

ROGINSKY, V., LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SANCHEZ, C., YOUNG, L., MARRERO, E., HARVEY, A., **Efecto inhibitorio de un extracto acuoso de las hojas de *Allophylus cominia* (L.) Sw sobre las proteínas tirosina fosfatasa 1B y dipeptidil peptidasa IV**. Revista Cubana de Farmacia.(4) p. 672-683. 2014.

SILVA, D.M., MARTINS, J.L.R., FLORENTINO, I.F., 2016. **The gastroprotective effect of *Memora nodosa* roots against experimental gastric ulcer in mice**. An. Acad. Bras. Ciênc. 88, 1819–1828.

SILVIA, M., *Sapindaceae Juss. Aportes Botánicos de Salta-Serie Flora*. Herbario MCNS Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta, Buenos aires, Argentina. Guías ilustradas de Clases Vol. 7 p. 1-2 2004

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.;

SINGER, O. **Camomila**. Monografia. Curso de Especialização em Ciências Farmacêuticas. UFPR, 50p, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SONMER, G. V., **Sanpidaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico de Rio de Janeiro. 2013

SOMNER, G. V., FERRUCCI, M. S., ACEVEDO-RODRIGUEZ, P., COEHLO, R. L. G. 2015. **Allophylus in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br./jabot/floradobrasil/FB20875> Visitado: 12 de oct 2016.

STEPONKUS, P. L., LANPHEAR, F.O., Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, 1423-26, 1967.

STICKEL, F., SEITZ, H.K., 2000. **The efficacy and safety of comfrey**. Public Health Nutr. 3, 501–508.

TOREQUI, I., **In vitro antimicrobial and brine shrimp lethality of *Allophylus cobbe* L.** Disponível em: <http://www.ayujournal.org>. Visitado: 06/08/2016.

TREVISAN, R.R. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológica das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent ULMACEAE**. Curitiba, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

TREVIZAN, L.N., NASCIMENTO, K., SANTOS, J., KASSUYA, C., CARDOSO, C. **Anti-inflammatory, antioxidante and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of viridiflorol: Themajor constituent of *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk.** Journal of Ethnopharmacology 192 p. 510–515. 2016.

TROPICOS Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/28600072>. Acessado el 15/05/2017.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Uso Plantas Medicinais. **Revista Arquivos FOG – Saúde Sociedade e Meio Ambiente**, vol. 5 (1): 33-41, 2008.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho do Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmacia y Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.1, n.1, p.1;112, 1963.

ZANDONAI, R., COELHO, F., FERREIRA, J., MENDES, A. **Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in**

murine spleen cells. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 46, n. 2. 2010

ZHANG, L., LIAO, H., ZHU, H., LEI, C. **Antiviral clerodane diterpenoids from *Dodonaea viscosa*.** Tetrahedron 72 P. 8036-8041. 2016.

ANEXO 1 – AUTORIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE ACCESO AL PATRIMONIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
Presidente